

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estructura de la cromatina de eritrocito de pollo : estudios
proteolíticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rosa María Nieto-Sandoval Sansegundo

DIRECTOR:

Luis Franco Vera

Madrid, 2015

Rosa María Nieto-Sandoval Sansegundo



X-53-01317-E

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA DE ERITROCITO DE POLLO.
ESTUDIOS PROTEOLITICOS

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983

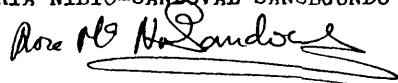


BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 185/83

© Rosa María Nieto-Sandoval Sansegundo
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M- 27488-1983

AUTOR: ROSA MARIA NIETO-SANDOVAL SANSEGUNDO



ESTRUCTURA DE LA CROMATINA DE ERITROCITO DE
POLLO. ESTUDIOS PROTEOLITICOS.

DIRECTOR: Dr. D. Luis Franco Vera, Catedrá-
tico del Departamento de Bioquími-
ca de la Facultad de Ciencias Bio-
lógicas de la Universidad de Valen-
cia.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica
1982

El presente trabajo se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del prof. D. Luis Franco Vera, a quien debo expresar mi agradecimiento por sus enseñanzas y dedicación.

Agradezco igualmente al prof. D. Angel Martín Municio, Catedrático-Director del Departamento de Bioquímica, el apoyo prestado a esta investigación.

Asimismo, deseo expresar mi reconocimiento a todos mis compañeros, en especial a los profs. José Luis Barbero, Rafael Caballero, José Luis Castro, Blanca Fernández, Consuelo Jiménez, Gabriel Márquez, Francisco Montero, Federico Morán y Julián Perera.

Por la ayuda y el trabajo dedicado, quiero expresar mi agradecimiento a los profs. Ricardo Belmonte, Isidoro López-Braña, Jacinto M. Nablet y José Pérez-Ballester.

A Miguel y Rosario

ABREVIATURAS

p.b.	—	par de bases
M.E.	—	microscopio electrónico
D.C.	—	dicroísmo circular
EDTA	—	ac. etilendiaminotetraacético
Tris-ClH	—	Tris (hidroximetil) aminoetano -clorhidrato
PMSF	—	Fluoruro α -Toluen sulfonilo
PCA	—	ácido perclórico
p:v	—	peso a volúmen
p:p	—	peso a peso
HMG	—	proteínas cromosomales no histonas de alta movilidad electroforética
DPCC	—	cloruro de difenil carbamilo
BAPNA	—	Na-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
TEMED	—	N,N,N',N' tetrametiletilendiamina
SDS	—	dodecilsulfato sódico
rms	—	desviación normal estandar
U.V.	—	ultravioleta
TLCK	—	Na-p-tosil-L-lisina clorometil cetona

INDICE

	<u>Págs.</u>
1.- INTRODUCCION -----	1
1.1. La cromatina: su composición -----	1
1.2. Estructura del nucleosoma -----	5
1.2.1. El core nucleosomal -----	10
1.2.2. El cromatosoma -----	17
1.2.3. Influencia de la fuerza iónica en la su- perestructura nucleosomal -----	23
1.3. Superestructura de la fibra cromosomal -----	25
1.3.1. Influencia de la fuerza iónica en la su- perestructura de la cromatina -----	32
1.4. Los enzimas proteolíticos en el estudio estruc- tural de la cromatina -----	35
1.5. Dirección de la investigación realizada -----	42
 2.- MATERIALES Y METODOS -----	 45
2.1. Aislamiento de núcleos -----	46
2.2. Obtención de cromatina soluble -----	47
2.3. Extracción selectiva de histonas H1 y H5 de cro- matina soluble -----	48
2.3.1. Disociación salina -----	48
2.3.2. Tratamiento con resina de intercambio ca- tiónico -----	49
2.3.3. Método del ácido cítrico -----	49
2.4. Extracción de histonas -----	50
2.5. Incubación con nucleasa de micrococo -----	51

2.6. Incubación con desoxirribonucleasa I -----	52
2.7. Incubaciones con tripsina -----	52
2.8. Estudio de la actividad de la tripsina -----	54
2.8.1. Influencia de la temperatura -----	54
2.8.2. Influencia de la fuerza iónica -----	55
2.9. Cinéticas de titulación automática -----	56
2.10. Cinéticas de digestión triptica seguidas por D.C. a 280 nm -----	58
2.11. Métodos analíticos -----	59
2.11.1. Electroforésis -----	59
2.11.1.1. Electroforésis de histonas ---	59
2.11.1.2. Electroforésis de DNA en con- diciones no desnaturalizantes	61
2.11.1.3. Electroforésis de DNA en ge- les de agarosa -----	62
2.11.1.4. Electroforésis de DNA en con- diciones desnaturalizantes ---	64
2.11.2. Ultracentrifugación en gradiente de sa- carosa -----	65
2.11.3. Espectros de absorción -----	65
2.11.4. Espectros de dicroísmo circular -----	66
2.11.5. Métodos de análisis de curvas -----	67
2.11.5.1. Curvas de titulación automática	67
2.11.5.1.1. Métodos de análisis gráfico	68
2.11.5.1.2. Análisis mediante programa de cálculo -----	69
2.11.5.2. Curvas de dicroísmo circular --	71
2.11.5.2.1. Métodos de análisis gráfico	72
2.11.5.2.2. Análisis mediante programa de cálculo -----	73

3. RESULTADOS Y DISCUSION -----	74
3.1. Propiedades de la cromatina soluble -----	75
3.1.1. Espectro de absorción -----	75
3.1.2. Espectro de dicroísmo circular -----	75
3.1.3. Electroforésis de histonas -----	77
3.1.4. Estudio del tamaño de los fragmentos de <u>cro</u> <u>matina</u> obtenidos en el proceso de solubili- zación -----	77
3.1.4.1. Electroforésis en geles de agarosa	80
3.1.4.2. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa -----	80
3.1.5. Incubación con nucleasa de micrococo -----	83
3.1.6. Incubación con desoxirribonucleasa I -----	85
3.1.7. Extracción selectiva de las histonas H1 y H5 de la cromatina soluble -----	87
3.1.7.1. Disociación salina -----	87
3.1.7.2. Método del ácido cítrico -----	90
3.1.7.3. Tratamiento con resina de intercam bio catiónico -----	92
3.1.8. Influencia de la fuerza iónica en la estruc tura de la cromatina -----	92
3.2. Experimentos de hidrólisis triptica -----	96
3.2.1. Optimización del método	
-----	96
3.2.1.1. Inhibición de la acción triptica -	98
3.2.1.2. Influencia de la temperatura en la actividad de la tripsina -----	100

3.2.1.3. Influencia de la fuerza iónica en la actividad de la tripsina -----	102
3.2.2. Cinética de hidrólisis triptica de histonas en la cromatina -----	104
3.2.3. Hidrólisis con desoxirribonucleasa I de di- geridos tripticos de cromatina -----	115
3.2.4. Hidrólisis con nucleasa de micrococo de cro- matina digerida con tripsina -----	118
3.2.5. Cinéticas de hidrólisis triptica seguidas mediante titulación automática -----	119
3.2.6. Cinéticas de hidrólisis triptica seguidas por dicroismo circular -----	123
3.2.6.1. Digestiones a tiempos discretos --	129
3.2.6.2. Digestiones continuas -----	135
3.2.6.2.1. Cromatina nativa -----	136
3.2.6.2.2. Cromatina desprovista de his- tonas H1/H5 -----	160
3.3. Discusión general -----	179
4. CONCLUSIONES -----	200
5. BIBLIOGRAFIA -----	207

INTRODUCCION

1.1.- La cromatina: Su composición

La información genética de todos los seres vivos tiene su sede en el ácido desoxirribonucleico (DNA). Las moléculas de DNA no solamente pueden dar lugar a copias exactas de sí mismas, sino que además, sirven de molde en el delicado proceso de transcripción. De la importancia de este proceso, y de la regulación a que tiene que estar sometido, da idea el hecho de que en organismos pluricelulares se puedan observar células fenotípicamente muy distintas cuyo genotipo (composición de su DNA) es, sin embargo, el mismo.

El DNA, pues, no sólo desarrolla una función estática como almacén de la información genética, sino también en extremo dinámica en cuanto al modo y regulación de la transmisión de dicha información.

En organismos eucariontes, el DNA se encuentra mayoritariamente localizado en el núcleo celular formando parte de un complejo supramolecular denominado cromatina. Esta denominación no da cuenta de un orgánulo subcelular concreto, sino de un material que puede ser aislado y purificado como una entidad propia, y que posee una composición química característica.

El análisis químico de la cromatina indica que está formada por DNA, RNA y proteínas. El porcentaje de RNA presente en preparaciones de cromatina procedentes de especies y tejidos distintos es muy variable, siendo más elevado cuanto mayor sea la tasa transcripcional de la especie o tejido de procedencia. Su presencia se atribuye a moléculas de RNA nacientes producidas por transcripción, aunque no puede descartarse por el momento que cierta fracción

de éste RNA posea una función estructural (Thomas y col., 1976). En cuanto a la parte proteica del material genético, se ha dividido en dos clases principales:

- Una formada por proteínas básicas carentes de actividad enzimática denominadas histonas.
- Otra más heterogénea compuesta por proteínas ácidas o neutras denominadas proteínas no histonas, muchas de las cuales poseen actividad enzimática.

Se han caracterizado 5 fracciones principales de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4, que están presentes en todos los materiales analizados hasta la fecha, con excepción de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la que no se ha encontrado la histona H1 (Franco y col., 1974; Fernández, 1979). Además de estas fracciones principales, se ha encontrado otra histona en la cromatina de eritrocitos nucleados (Neelin y col., 1964) llamada H5.

Según su composición, y atendiendo a la proporción relativa de lisina y arginina, se han clasificado las histonas en ricas en lisina (H1 y H5), moderadamente ricas en lisina (H2A y H2B) y ricas en arginina (H3 y H4). En la tabla I se muestran algunas de las características moleculares que definen a cada una de las fracciones de histona.

Las estructuras primarias de las histonas presentan una clara asimetría respecto a la distribución de los residuos a lo largo de la cadena peptídica. Las regiones amino terminales de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son muy básicas y contienen una gran proporción de residuos que desestabilizan la estructura en α -hélice. Las regiones centrales y C-terminales poseen una mayor propor

TABLA I : Características moleculares de las histonas.

FRACCION		TAMARO (n° residuos) (IV)	PESO MOLECULAR (IV)	% Lys (mol %) (IV)	% Arg (mol %) (IV)	% Lys (mol %) (IV)	DOMINIOS ESTRUCTURALES
(I)	(II)	(III)					
H1	H1	I	213	21.000	27.7	1.4	1-40 40-115 115-213 (V)
H5	H2c	V	197	21.500	24.6	11.0	1-22 22-100 100-197 (VI)
H2B	H2b	IIB2	125	13.774	15.2	6.1	1-37 37-125 (VII)
H2A	H2a2	IIB1	129	13.960	10.9	9.3	1-31 31-129 (VII)
H3	H3	III	135	15.273	9.6	13.3	1-42 42-135 (VII)
H4	H2a1	IV	102	11.236	10.8	13.7	1-38 38-102 (VII)

(I) Nomenclatura basada en las normas de Ciba Foundation Symposium (1974)
 (II) " " " en fraccionamiento químico (Johns y Butler, 1962)
 (III) " " " en fraccionamiento por cromatografía de cambio de ión (Rasmussen y col., 1962)
 (IV) J. Perera (1979) Cuadernos de Biología Molecular vol. I p. 93.
 (V) J. Perera, J. 1978.
 (VI) Avilés y col., 1978.
 (VII) McChes y Felsenfeld, 1980.

ción de aminoácidos apolares y residuos que favorecen la α -hélice. La asimetría en la estructura primaria dá lugar a dos dominios es tructurales para estas histonas: una zona básica N-terminal y un dominio globular que abarca el resto de la molécula (McGhee y Fel senfeld, 1980). Las histonas H1 y H5 poseen tres dominios estruc- turales: dos regiones básicas N y C terminales y una zona central globular (Hartman y col., 1977).

Las histonas se encuentran en la misma proporción en peso que el DNA en todas las etapas del ciclo celular y en preparaciones procedentes de tejidos distintos, su función principal es la es- tructuración del material genético.

Las proteínas cromosomales no histonas (PNH) son mucho más va riables y heterogéneas que las histonas. Algunas de ellas pueden unirse específicamente al DNA y estimular su transcripción (Bekhor y Samel, 1977), por lo que se ha sugerido para ellas un papel im- portante en la regulación específica de la expresión genética (Paul y col., 1973). Dentro del grupo de las PNH, se encuentran las llamadas HMG (proteínas de alta movilidad electroforética), al gunas de las cuales podrían tener función estructural ya que son capaces de interaccionar con las histonas (Goodwin y col., 1977).

El estudio estructural de la cromatina, utilizando técnicas físicas como la difracción de rayos X, dió lugar a la proposición de algunos modelos en los que se suponía una estructura superheli- coidal continua para el DNA a la que se unirían de modo inespecí- fico las histonas manteniendo su estabilidad (Wilkins y col., 1959; Luzzati y Nicolayef, 1963; Pardon y Wilkins, 1972). Posteriormente, mediante datos obtenidos por microscopía electrónica (Olins y

Olins, 1973) y el empleo de técnicas bioquímicas como tratamiento con nucleasas (Hewish y Burgoyne, 1973), se superaron dichos modelos y se propuso un modelo de organización discontinua.

La microscopía electrónica reveló una disposición de la fibra de cromatina análoga a las cuentas de un collar, a cada una de las cuales se llamó cuerpo ν (Olins y Olins, 1973). Los datos de digestión con nucleasas, tanto endógenas (Hewish y Burgoyne, 1973; Van Holde y col., 1974) como del micrococo *S.aureus* (Honde y col., 1974; Sollner-Webb y Felsenfeld, 1975), indicaron una distribución discreta de fragmentos de 200 pares de bases (p.b.).

Oudet y col., en 1975 denominaron nucleosoma a éstas subunidades de 200 p.b. que son equivalentes a los cuerpos ν visualizados por microscopía electrónica.

1.2.- Estructura del nucleosoma.

Una vez establecida la naturaleza subunitaria y discreta de la cromatina, los estudios posteriores se enfocaron hacia el esclarecimiento de la estructura de la subunidad o nucleosoma.

El tratamiento suave de núcleos o cromatina con nucleasa de micrococo, mostró que la longitud del DNA nucleosomal variaba según la especie y tejido, en un intervalo comprendido entre 154 p.b. en *Aspergillus nidulans* (Morris, 1976) y 241 p.b. en células de esperma de Trucha (Spadafora y col., 1976). Tratamientos mas exhaustivos con el mismo enzima, daban lugar en todas las cromatinas estudiadas a fragmentos de 140 p.b. (Shaw y col., 1976; Morris, 1976;

Spadafora y col., 1976). A éste último producto de hidrólisis se le llamó "core nucleosomal". La longitud variable del DNA del nucleosoma se atribuyó a los segmentos internucleosomales que conectan dos "cores" sucesivos (Van Holde y col., 1974).

La resistencia mostrada al ataque nucleolítico por éstos 140 p.b. se interpretó como debida a protección por las histonas.

El análisis electroforético en gel de poliacrilamida de las histonas presentes en nucleosomas purificados, reveló la existencia de cantidades equimoleculares de las fracciones H2A, H2B, H3 y H4, y aproximadamente la mitad de H1 (Noll, 1974 a). Estos resultados, juntamente con la relación obtenida de DNA/histona (Noll 1974 a) son compatibles con el modelo propuesto de un octámero de histonas formado por dos copias de cada una de las fracciones H2A, H2B, H3 y H4, ó histonas internas, y una copia de la histona H1, o histona internucleosomal, por cada subunidad de la cromatina (Kornberg, 1974).

El estudio de las interacciones entre histonas que se producen en el interior del octámero nucleosomal, se ha abordado mediante experimentos de reticulación covalente y por análisis de los complejos formados por distintos pares de histonas en disolución utilizando técnicas físicas como la resonancia magnética nuclear.

La reticulación de histonas con suberimidato de dimetilo, en disoluciones de alta concentración salina, permitió la caracterización de un tetrámero de histonas ricas en arginina $(H3)_2(H4)_2$ y dímeros y oligómeros H2A-H2B. El proceso utilizado para el aislamiento de estas histonas, evitando al máximo su desnaturalización,

y empleando condiciones lo más próximas posible a las fisiológicas, hizo pensar que dichos productos obtenidos por reticulación, reflejaban el modo en que se encontraban las histonas asociadas en la cromatina. Así, el octamero de histonas nucleosomales se organizaría como un tetramero $(H3)_2(H4)_2$ y dos dímeros $(H2A)(H2B)$ (Kornberg y Thomas, 1974).

Las zonas implicadas en la interacción de las histonas ricas en arginina se delimitaron con más precisión mediante estudios de resonancia magnética nuclear (Moss y col., 1976; Puigdomenech y col., 1977), observándose que son sus segmentos apolares situados en la parte C-terminal de ambas moléculas, los que muestran más afinidad entre sí. Las zonas básicas N-terminales quedarían libres y podrían interaccionar con el DNA.

El estudio de la estequiometría y naturaleza de la interacción entre diversos pares de histonas puras en disolución, permitió establecer la existencia de complejos muy fuertes del tipo $(H3)_2(H4)_2$ y dímeros $H2A-H2B$ y $H2B-H4$ (D'Anna y Iseberg 1973, 1974a, 1974b). La importancia biológica de tales interacciones se corroboró mediante reticulación, tanto en cromatina como en núcleos, de histonas con reactivos bifuncionales o por irradiación con luz. u.v. Tales experimentos permitieron aislar dímeros $H2B-H4$ (Van Lente y col., 1975; Martison y McCarthy, 1975; Martison y McCarthy, 1976; Suda e Iwai, 1979); dímeros $H2A-H2B$ (Kelley, 1973; Van Lente y col., 1975; Martison y McCarthy, 1975); tetrameros $H2A-H2B$ (Kawashima e Imahori, 1979) y dímeros y tetrameros $H3-H4$ (Kornberg y Thomas, 1974; Kawashima e Imahosi, 1979).

Martison y McCarthy (1976) obtuvieron un trímero reticulado H2A-H2B-H4, en el cual la histona H2B actuaba de puente entre la H2A y la H4, con su parte N-terminal en contacto con la H2A y su mitad C-terminal unida a la H4.

Suda e Iwai (1979) concretaron más las zonas de contacto tanto intra como intermoleculares. obteniendo los siguientes productos de reticulación:

H2A (Lys 5 y Lys 9)
H2B (Lys 34 y Lys 35)
H2B (Lys 24 ó 27) y H2A (Lys 74)
H2B (Lys 85) y H4 (Lys 91)
H2B (Lys 120) y H3 (Lys 115)
H2B (Lys 120) y H4 (Lys 77)

Otra vía alternativa para el estudio de la función de las distintas histonas en la estructuración del DNA nucleosomal, la constituyó la experimentación basada en reasociación de fracciones individuales de histonas y mezclas de éstas con DNA. Los diferentes tipos de reconstituidos se sometieron después a la acción de proteasas y nucleasas y se estudiaron también utilizando técnicas físicas. Las histonas H3 y H4 resultaron ser las únicas en su capacidad de conferir al DNA ciertas características semejantes a las que posee en el nucleosoma (Camerini-Otero y col., 1976); ello, y la mayor conservatividad encontrada para estas histonas en su estructura primaria a lo largo de la escala evolutiva, llevó a adjudicar a las histonas ricas en arginina un papel fundamental en la organización del core nucleosomal.

La función de las histonas H2A y H2B quedaba mas confusa, pudiendo consistir en estabilizar el complejo H3-H4-DNA, ó bien, en

determinar el espaciado de los tetrameros $(H3)_2(H4)_2$ a lo largo de la fibra de DNA (Kornberg, 1974).

Otro modelo distinto de asociación de histonas dentro del nucleosoma, fué el propuesto por Weintraub y col., en 1975, que caracterizaron, utilizando técnicas hidrodinámicas, un tetramero formado por una molécula de cada una de las histonas internas. Este tetramero recibió el nombre de heterotípico por encontrarse en él histonas de distinta proporción relativa Lisina/Arginina; dentro del tetramero heterotípico, la sensibilidad de las histonas a hidrólisis trípica, su reactividad con ^{125}I etc... resultaba análoga a la mostrada por ella en cromatina nativa.

Tomando como base la existencia de este tipo de tetrameros Weintraub y col., en 1976 formularon un modelo según el cual cada nucleosoma estaría formado por dos semi-nucleosomas simétricamente apareados, que podrían separarse durante la transcripción.

El octámero de histonas nucleosomales puede aislarse y reticularse en soluciones de alta concentración salina (Thomas y Kornberg, 1975; Stein y col., 1977; Philips y col., 1979), pero su estabilidad en solución depende de las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica, así como de su propia concentración en la solución, disociándose fácilmente por simple dilución (Philip y col., 1980).

Los experimentos de reticulación entre histonas no proporcionaron más información acerca de la organización de las histonas nucleosomales; no obstante, si permitieron la formulación de varios modelos que justificaban los distintos productos de reticulación encontrados guardando, además, unas ciertas leyes de simetría (Tri

fonov, 1978; Mirzabekov y col., 1978).

Con respecto a la organización del DNA nucleosomal, estudios físicos de dispersión de neutrones sugirieron que el DNA se encuentra en el exterior del nucleosoma (Baldwin y col., 1975) indicando una forma de elipsoide de revolución oblato para el nucleosoma, con un eje mayor de 100 Å y un eje menor de 50 Å. (Pardon y col., 1977; Richards y col., 1977).

La localización externa del DNA nucleosomal ya había sido sugerida por Noll (1974b), que encontró que la digestión de núcleos con DNasa I daba lugar a una serie de fragmentos de DNA que resultaron ser múltiplos de 10 p.b. en electroforésis realizadas en condiciones desnaturalizantes. La periodicidad mostrada ante el ataque enzimático debía responder a algún tipo de subestructura dentro del nucleosoma, ya que se presentó en la cromatina aislada de organismos muy distanciados en la escala evolutiva (Schmitd, 1977; Phillips y Gigot, 1977; Cheah y Osborne, 1972; Lohr y col., 1977).

1.2.1.- El core nucleosomal

En 1977, Finch y col., lograron obtener partículas core cristalizadas. El análisis por microscopía electrónica y sobre todo, por difracción de rayos X de estos cristales, indicó que poseían unas dimensiones de 57 x 110 x 110 Å.

Los 140 p.b. del core nucleosomal describen alrededor del octamero de histonas una vuelta y tres cuartos. El diámetro de la superhélice formada es de aproximadamente 90 Å y su paso de rosca 28 Å. El n° de pares de bases de una vuelta estaría comprendido

entre 75 y 82 (Felsenfeld, 1978) y el DNA se encuentra en conformación B.

El análisis del modo de actuación de diversos enzimas, DNasa I, DNasa II y nucleasa micrococcal, sobre el DNA del core nucleosomal proporcionó más detalles sobre su modo de estructuración. Los tres enzimas producen cortes simétricos alrededor de un mismo punto si tuado periódicamente cada $10\ n+1$ bases del extremo 5' del DNA de la partícula core; por otra parte, los lugares de corte en ambas hebras del DNA se encuentran desplazados 1 base (DNasa I) ó 2 ba ses (DNasa II) alrededor de cada punto $10\ n+1$ reconocido por el enzima.

Mediante el marcaje radiactivo del fosfato 5'terminal y el es tudio de los fragmentos obtenidos enzimáticamente, se observó que las posiciones hidrolizadas por la DNasa I eran: 12, 22, 32.... ($10\ n+2$), siendo las accesibles a la DNasa II: 13, 23, 33... ($10\ n+3$). Estas posiciones se encuentran situadas en el surco estrecho de DNA, mientras que la nucleasa de micrococo actúa en el surco ancho (Fig. 1).

De estos estudios se desprende, por otra parte, que de cada 10 pares de bases, 6 resultan protegidas mientras que cuatro son accesibles a los enzimas hidrolíticos.

Lutter, en el mismo año, obtuvo las frecuencias relativas de corte de la DNasa I en cada una de las posiciones. El análisis de dichas frecuencias indicó la existencia de un eje de simetría binario en la posición 71 que daba lugar a la obtención de frecuencias de corte análogas en puntos equidistantes en ambas hebras al rededor de esta posición. También propuso la existencia de un pun

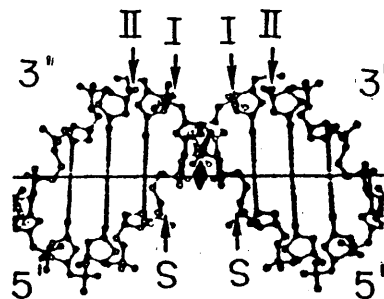


Fig. 1.- Localización de los sitios de corte de los enzimas DNasa I (I), DNasa II (II) y nucleasa de micrococo (S), en el DNA del "core nucleosomal".

◆ Eje de simetría situado en el plano de la página.

(Sollner-Webb y col., 1978)

to de simetría secundaria en la posición 71 que implicaba cierta relación de frecuencias en posiciones equidistantes dentro de una hebra del DNA, del mismo modo, era posible obtener una relación análoga para puntos separados por 80 bases dentro de una misma cadena.

La interpretación espacial de éstos datos evidenciaba un sentido de enrollamiento levogiro del DNA alrededor del núcleo de histonas, indicando, como número más probable, 80 p.b. por giro de la hélice.

El conocimiento de la organización primaria de las histonas a lo largo del DNA, experimentó un avance considerable mediante la aplicación de una técnica de reticulación histona-DNA, que consiste en la unión de residuos de lisina al DNA, parcialmente despurinizado, de partículas "core". La rotura posterior del ácido nucleíico en ese punto, deja ligada la histona al fragmento 5'terminal del DNA. Mediante electroforesis bidimensional, es posible después determinar la naturaleza de la histona reticulada y la longitud del DNA al que se encuentra unida. Todo ello ha permitido la construcción de un mapa de alta resolución que describe el orden de distribución de las histonas a lo largo del DNA del "core nucleosomal".

Las histonas parecen encontrarse regularmente ordenadas a lo largo de segmentos discretos de DNA de una longitud de 6 nucleotíidos; éstos segmentos están separados entre sí por zonas de 4 nucleotíos libres de histonas. Dicha distribución probablemente se realize de modo similar sobre cada cadena del DNA, pudiendo una histona dada, unida a un segmento discreto de una de las cadenas, os

cilar hacia la complementaria a través del surco grande del DNA.

Las fig. 2 y 3 ilustran los modelos propuestos por Shick y col. (1980) para ésta ordenación.

En el modelo lineal, cada una de las dos moléculas de cada histona interna se encuentra localizada por entero en una de las mitades del DNA del core. Esta distribución es compatible con la propuesta por Weintraub y col. (1976) que suponía cada nucleosoma formado por dos seminucleosomas. La existencia de seminucleosomas ha sido descrita también por otros autores (Tsanev y Petrov, 1976; Oudet y col., 1978).

El modelo tridimensional muestra una distribución semejante al lineal; la única diferencia se refiere a la localización de las histonas H3 y H2A, que, en este caso, se unen simultáneamente al DNA de la región central de una banda, y al DNA de los extremos de la banda complementaria perteneciente a "distinta mitad" del "core nucleosomal". Este modelo sugiere que las histonas H3 y H2A podrían encontrarse "cerrando" el DNA del core nucleosomal. La localización de la histona H3 en los extremos del nucleosoma se ha puesto de manifiesto mediante los experimentos realizados por Simpson (1978a).

En ambos modelos puede observarse que los 20 p.b. de cada extremo 5' del DNA se encuentran libres sin interaccionar con las histonas, lo cual es compatible con los resultados obtenidos por desnaturalización térmica; la fusión de cores nucleosomales en tampón cacodilato 1 mM a pH=7.2, es un proceso bifásico con inflexiones a 60°C y 74°C (Weischet y col., 1978). La primera fase de fusión se interpreta como desnaturalización de alrededor de 40 p.b.

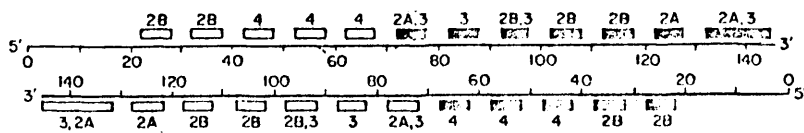


Fig. 2.- Modelo lineal de ordenación de las histonas sobre ambas cadenas del DNA del "core nucleosomal". Las cajas abiertas o rellenas indican la localización en mitades distintas del DNA de cada una de las dos copias de las histonas.

(Shick y col., 1980)

y la segunda corresponde a los restantes 100 p.b. que se encuentran mas protegidos.

Simpson en 1979 propuso dos dominios estructurales para el DNA del core nucleosomal:

- Dos zonas terminales de 20 p.b. cada una que interaccionan poco con el octamero de histonas.
- Una región central de 100 p.b. mas protegida.

Los experimentos de reconstitución realizados por Noll y col. (1980) establecen, por otra parte, que la longitud mínima de DNA capaz de complejarse con el octamero de histonas nucleosomales, es de 108 p.b.

1.2.2.- El Cromatosoma.

Simpson (1978b) dió la denominación de cromatosomas a unas partículas de 160 p.b. de DNA asociadas al octamero de histonas internas mas una molécula de H1 (ó H5).

Estos fragmentos de 160 p.b. se producen en el transcurso de la digestión de núcleos con nucleasa endógena o micrococal y suponen un producto intermedio entre el nucleosoma de 200 p.b. y el core nucleosomal de 140 p.b. (Simpson y Whitlock, 1976).

La reducción nucleotílica de 160 a 140 p.b. va acompañada de la liberación de la histona H1 (Shaw y col., 1976).

La longitud del cromatosoma es constante en todas las especies y tejidos de los que se ha aislado. Esta propiedad junto con el hecho de que se encuentren presentes en él todas las histonas, hace que su estudio revista particular interés, tanto por la información

que puede suministrar acerca de la situación de la histona H1, como por considerarla la unidad básica de la fibra cromosomal.

El perfil de desnaturalización térmica de los cromatosomas en EDTA 0,25 mM a pH=7.0 es monofásico, con la inflexión situada en 77,5°C. La desaparición de la transición a 60°C en los cores nucleosomales, ha sido interpretada por Simpson suponiendo que la histona H1 (ó H5) no solo protege los 20 p.b. adicionales de esta partícula con respecto al core nucleosomal, sino también los otros 20 p.b. de las regiones extremas del DNA del propio core nucleosomal.

La frecuencia de corte de la DNasa I en cromatosomas, sugiere que los 20 p.b. adicionales del cromatosoma están situados simétricamente 10 a cada lado del DNA del core nucleosomal, completando así dos vueltas de 80 p.b. Esto fuerza a que los puntos de entrada y salida del DNA en el cromatosoma se encuentren muy próximos (Simpson, 1978 b).

Posterior información acerca de la localización de las distintas zonas de la histona H1 (ó H5) en el cromatosoma, pudo obtenerse por medio de los trabajos de reconstitución de cromatina con diferentes regiones de la molécula de H1 y de H5, y el estudio de las cromatinas reconstituidas; en su accesibilidad a nucleasa micrococal y comportamiento hidrodinámico (Allan y col., 1980).

Las histonas H1 y H5 poseen dos dominios básicos N y C terminales y un dominio central globular. Ninguna de las tres zonas por separado fué capaz de dar a la cromatina reconstituida las características de sedimentación que posee con la histona intacta, ahora bien, la zona globular de una u otra histona resultó ser la más

eficiente en el desarrollo de esta función. La accesibilidad a nucleasa micrococcal también señaló a las zonas globulares como únicas en su capacidad de proteger un fragmento de 168 p.b. Todo ello, junto con la mayor preferencia mostrada por dichas zonas para interactuar con el DNA superhelicoidal (Singer y Singer, 1976), llevó a Allan y col., (1980) a la proposición de un modelo de localización de éstas histonas en el cromatosoma (veasé fig. 4).

Otro modelo para el cromatosoma sugerido por Belyavsky y col. (1980) es el que se muestra en la fig. 5. Su elaboración se realizó usando el tipo de experimentación ya descrito en el apartado 2.1. (párrafo 7). Según Belyavsky, las histonas internas (H2A, H2B, H3 y H4) se distribuyen en el cromatosoma de manera análoga a como lo hacen en el core nucleosomal, pero con un desplazamiento en sus puntos de unión al DNA de 10 nucleotidos en ambas cadenas a partir del extremo 5'terminal del cromatosoma. Las histonas internas sufren una expansión de modo que llegan a ocupar la longitud total del DNA del cromatosoma.

La histona internucleosomal (H1 ó H5) se une principalmente a los extremos del DNA del cromatosoma, pero también tiene contactos a lo largo de toda la longitud del DNA, interactuando con las regiones de 4 nucleotidos distribuidas cada 10 n bases que dejan libres las histonas internas. (veasé fig. 6)

La proximidad de la histona H1 a las histonas internas justifica, por otra parte, la obtención de los siguientes complejos por reticulación en núcleos o cromatina: dímeros H1-H2A (Bonlikas, 1980), dímeros H1-H2B y H1-H3 (Hardison, 1977) y polímeros H1-H3-H4 (Glotov y col., 1978).

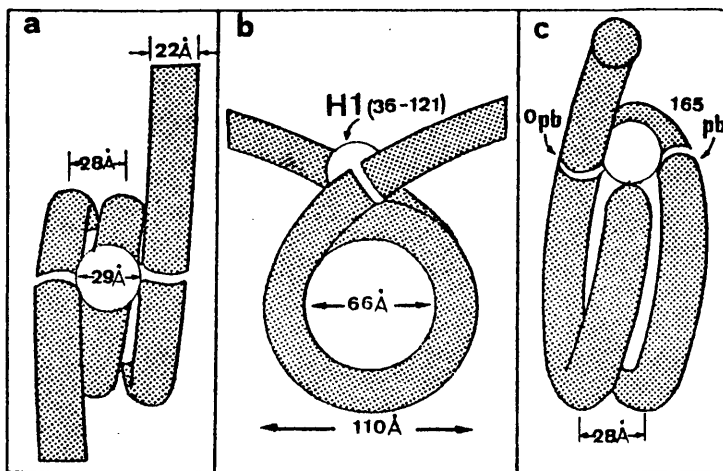


Fig. 4.- Modelo propuesto para la localización del dominio globu
lar de las histonas muy ricas en lisina en el cromatoso
ma.

(Allan y col., 1980)

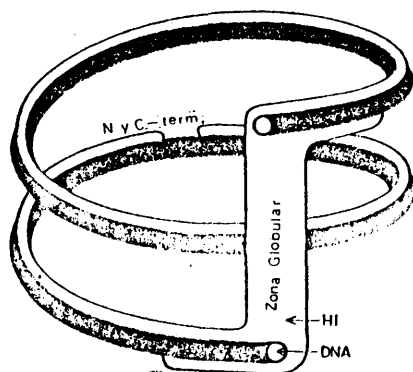


Fig. 5.- Localización de la histona H1 en el cromosoma según
Belyavsky y col. (1980)

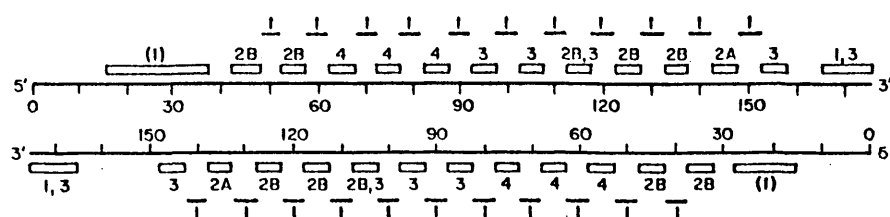


Fig. 6.- Posición de las histonas en el DNA del cromosoma.

(1) lugar principal de unión de la histona H1

┃ contactos de la histona H1 a lo largo del DNA del cromosoma

(Belyavsky y col., 1980)

1.2.3.- Influencia de la fuerza iónica en la estructura nucleosomal.

El core nucleosomal de 140 p.b. contiene 280 grupos fosfato cargados negativamente, a los que pueden sumarse 33 cargas negativas procedentes de las histonas. El número de cargas positivas aportadas por los residuos de lisina, arginina e histidina de las histonas es tan solo de 118 (Fasman y col., 1977). La vuelta y tres cuartos que dan los 140 p.b. alrededor del core proteico implica que dos segmentos de DNA de alrededor de 60 p.b. se encuentran muy próximos en la superficie nucleosomal, ya que la separación entre ambos giros de la hélice es tan solo de 5-10 Å.

La mayor o menor concentración de iones en el medio puede provocar variaciones estructurales que impliquen cambios en el volumen de la partícula que tiendan a mantener constante la densidad de carga. El estudio de dichos cambios conformacionales no sólo puede dar idea de las transformaciones que es posible que sufra el nucleosoma durante el proceso de transcripción, sino también es interesante por sus implicaciones en las estructuras de mayor orden de la fibra cromosomal.

Gordon y col. (1978) encontraron dos transiciones en partículas de 140 a 160 p.b. La primera se producía a una concentración de ClNa comprendida entre 0,7 y 2 mM, y la segunda en un intervalo de 5 a 11 mM. Ambas se caracterizaban por un aumento brusco del coeficiente de sedimentación y un descenso de la elipticidad molar a 282 nm. El aumento de entropía asociado a ambas transiciones indica que la disminución de la fuerza iónica implica el paso de una conformación compacta ordenada a otra intermedia menos ordenada, y de ésta a una estructura abierta.

Ambas transiciones se presentan en un intervalo de pH de 6 a 9 pero no son observables a pH=5. La protonación a éste pH de algunos grupos carboxilo e histidilo de las cadenas proteicas podría dar lugar a una disminución de la carga negativa de la partícula que traería consigo una disminución de la energía electrostática de expansión. Por otra parte, a pH ácido es posible que se rompan contactos específicos entre las histonas que resulten necesarias para la variación de la forma del nucleosoma (Gordon y col., 1979); los experimentos de reticulación realizados por Martison y col. (1979) indican la pérdida de cuatro sitios de contacto distintos entre las histonas H2B y H4.

Un factor a tener en cuenta en el estudio de las transiciones nucleosomales a baja fuerza iónica, es la longitud del DNA de la partícula nucleosomal. De las dos transiciones observadas por Gordon y col. (1978), la primera ha sido atribuida a los cores de 140 p.b.; mientras que la segunda parece ser propia de los cromatosomas de 160 p.b. (Gordon y col., 1979; Dietrich y col., 1980).

La utilización de técnicas de fluorescencia y el marcaje de la cisteína de la parte C-terminal de la histona H3, ha permitido a Dietrich y col. (1979) describir cuatro estados distintos para partículas core existentes a distintas fuerzas iónicas.

- I. En el primer estado (para fuerza iónica 0,5 mM) la estructura es abierta y flexible. La separación de las dos cisteínas de ambas moléculas de H3, es de alrededor de 48 Å.
- II. En el segundo estado (para fuerza iónica 0,5-100 mM), la conformación es mas rígida y elipsoidal, estando ambas cisteínas mas próximas e internas en la matriz proteica.

- III. En el tercer estado (para fuerza iónica 100-400 mM) se mantiene la conformación rígida pero existe un ligero incremento en la apertura.
- IV. El cuarto estado (a fuerza iónica 600 mM) se caracteriza por una separación entre las dos cisteínas (Fig. 7).

1.3.- Superestructura de la fibra cromosomal.

La sucesión de nucleosomas a lo largo del DNA dá lugar a una fibra de cromatina de 100 \AA de diámetro, que al M.E. tiene la apariencia de cuentas de collar ordenadas linealmente. Esta fibra puede considerarse como el primer nivel estructural de la fibra cromosomal. Su condensación posterior origina otros niveles estructurales superiores, así como un mayor grado de empaquetamiento del DNA.

En determinadas condiciones es posible visualizar al M.E. filamentos gruesos de 300 \AA de diámetro (Du Praw, 1966) que se suponen originados por plegamientos o enrollamientos del filamento fino (Ris, 1975).

La formación y estabilización de los filamentos gruesos parece estar mediada por la presencia de la histona H1. La eliminación de esta histona en oligonucleosomas origina un aumento de su coeficiente de fricción (Noll y Kornberg, 1977) que es consecuente con la adopción, por parte de estos, de una conformación más extendida. Además, la cromatina sin H1 posee una temperatura de desnaturalización menor (Reeck y col., 1972) y una viscosidad intrínseca mayor que la nativa (Henson y Walker, 1970; Lewis y col., 1976).

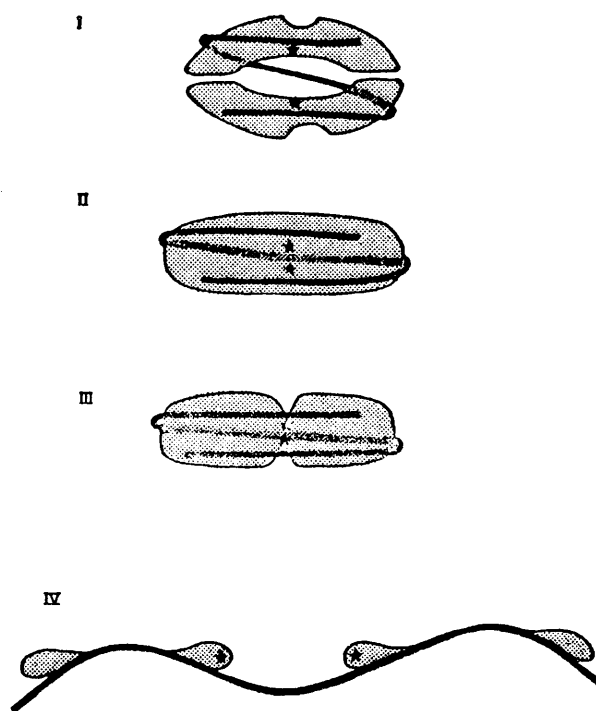


Fig. 7.- Esquema de los estados estructurales del "core nucleoso
mal" bajo diferentes condiciones salinas.

★ Cisteína 110 de la histona H3

(Dieterich y col., 1979)

Otro factor importante para la estabilidad de los filamentos gruesos, lo constituye la presencia de iones en el medio. En medios de baja fuerza iónica solo son visibles al M.E. los nucleofilamentos de 100 Å (Olins y Olins, 1974).

Los estudios de dispersión de neutrones de las fibras de 300 Å sugieren que los nucleosomas se pliegan en forma de solenoide. El solenoide tendría, según estos datos, un diámetro de 300 Å, un paso de rosca de 100 Å y un hueco central de 100 Å de diámetro (Carpenter y col., 1976). Estas estructuras solenoidales se habían puesto anteriormente de manifiesto también por microscopía electrónica (Finch y Klug, 1976). El número de nucleosomas por vuelta del solenoide estaría comprendido entre 4 y 10, pudiendo existir en solución "familias de solenoides" con diferente grado de compactación y distinto número de nucleosomas por vuelta (Suau y col., 1979); no obstante el número de 6 nucleosomas por vuelta es el más aceptado, y el que también indican los estudios de birrefringencia eléctrica realizados por Marion y Roux (1978).

Otros detalles acerca de la estructura del solenoide, como la orientación de las subunidades dentro de él, no están aún plenamente establecidos. Los resultados de McGhee y col. (1980) apuntan hacia una orientación ortogonal de los cromatosomas, que estarían dispuestos de forma radial; su sección transversal sería la que aparece en la fig. 8.

Otro tipo de estructura secundaria alternativo al solenoidal es el que se conoce como modelo de los "Superbeads". Según este modelo los nucleosomas se agrupan a lo largo de la fibra de cromati

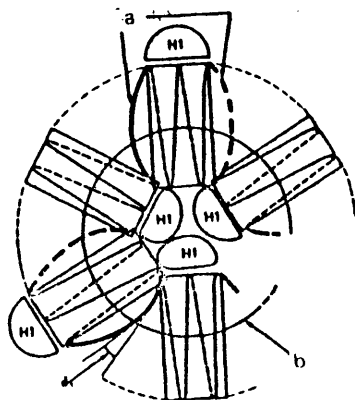


Fig. 8. - Sección transversal de un solenoide de 300 Å de diámetro.

a - DNA internucleosomal superhelicoidal

b - eje del DNA internucleosomal superhelicoidal

δ_1 - ángulo formado por la tangente al DNA internucleosomal y la normal al eje de ésta.

(McGhee y col., 1980)

na dando lugar a partículas discretas de aspecto globular (superbead) de 200-300 Å de diámetro sin originar una formación helicoidal.

El modelo de los superbeads tiene su origen en la observación realizada por Hozier y col. (1977) de que existe una pausa en la cinética de digestión con nucleasa, tanto de núcleos como de fibras cromosomales, en la que se liberan partículas que poseen un coeficiente de sedimentación de 40 S y contienen aproximadamente ocho nucleosomas. Al M.E. dichas partículas poseen una configuración globular siendo su diámetro 200 Å.

El tratamiento de cromatina con nucleasas específicas de DNA monocatenario ha evidenciado también la existencia de sitios susceptibles a estos enzimas distribuidos a intervalos de 8 a 80 nucleosomas (Fujimoto y col., 1979).

El número de nucleosomas que integran un superbead es variable, habiéndose propuesto también el de 12 como número medio (Renz, 1977). Este número estaría más de acuerdo con los polímeros de 12 o múltiplo de 12 moléculas de H1, obtenidos por reticulación con suberimidato de dimetilo de núcleos o cromatina (Itkes y col., 1980).

La obtención de solenoides o superbeads puede depender del método utilizado en el proceso de obtención de la cromatina. Worcel (1978) ha propuesto que los superbeads pueden originarse de un solenoide discontinuo interrumpido regularmente cada dos giros. También Thoma y col. (1979) interpretan los superbeads como estados intermedios de condensación del nucleofilamente para dar lugar al solenoide.

En cualquier caso, la fibra de estructura secundaria es susceptible aún de mayores índices de estructuración. Schmitz y Ramana-

than proponen un nivel terciario de organización para la fibra so
lenoidal (Fig. 9).

Este modelo tiene su base en la preferencia mostrada por la histona H1 hacia las zonas de DNA ricas en A-T. El DNA de los organismos eucariontes posee secuencias repetitivas de alrededor de 300 p.b. y no repetitivas de 800-1000 p.b. Los dos tipos de secuen
cias están mezclados, siendo la longitud total de ambas regiones aproximadamente 1200 p.b. que es equivalente a la longitud de 6 nucleosomas.

La distribución de las regiones ricas en A-T no es al azar, sino que estas zonas se encuentran concentradas en los espacios in
ternucleosomales, lo que implica una disposición de bloques a lo largo de la estructura secundaria hacia los cuales tendría una gran afinidad la histona H1.

Según Schmitz y Ramanathan, el proceso que inicia la estructu
ra a nivel terciario de la fibra, es un cambio de conformación de los residuos 72-106 de las histonas ricas en lisina. Este cambio va acompañado por un aumento de afinidad del dominio globular de estas histonas por DNA superhelicoidal de cores adyacentes. Como los bloques ricos en A-T se encuentran dispuestos helicoidalmente a lo largo de la estructura 2^{ria}, y a ellos pueden unirse mas de una molécula de H1, podrían formarse puentes conectando la región internucleosomal, con dos "cores" adyacentes. El efecto acumulati
vo de gran número de conexiones acarrearía la formación de la hélice de 1000 Å de espesor.

Un giro de esta hélice comprende aproximadamente 12 vueltas del solenoide.

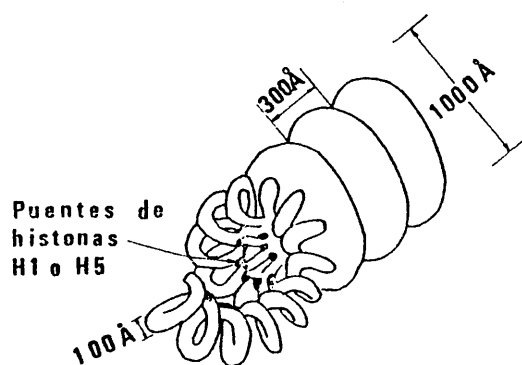


Fig. 9.- Modelo propuesto para el plegamiento en un tercer nivel de organización de los polinucleosomas.
(Schmitz y Ramanathan, 1980)

1.3.1.- Influencia de la fuerza iónica en la superestructura de la cromatina.

Del mismo modo que la partícula core y el cromatosoma sufren una transición estructural a baja fuerza iónica, en el intervalo de 1-3 mM y 7 mM respectivamente, también los fragmentos grandes de cromatina, desprovistos previamente de las histonas ricas en lisina, tienen un cambio conformacional en este intervalo (0,75-7mM) (Fulmer y Fasman, 1979). Tal variación en la estructura se refleja en alteraciones de su espectro de dicroísmo circular y de su perfil de desnaturalización térmica. La comparación del comportamiento de la cromatina intacta y la cromatina sin H1 (H5), permite poner de manifiesto el papel de estas histonas en la estabilización de la estructura nucleosomal a baja fuerza iónica.

El estudio más sistemático del efecto de la fuerza iónica en la morfología de la cromatina intacta y desprovista de histona H1, lo ha realizado Thoma y col. (1979).

Las micrografías de cromatina en ClNa 1 mM, muestran un filamento de nucleosomas, o nucleofilamento, que va condensándose progresivamente al aumentar la concentración salina del medio, dando lugar a una serie de estructuras helicoidales con distinto nº de nucleosomas por vuelta hasta que, al llegar a ClNa 60 mM, se obtiene el solenoide perfectamente estructurado con características semejantes a las descritas por Finch y Klug (1976).

La cromatina privada de histonas ricas en lisina también se condensa al aumentar la fuerza iónica pero no da lugar a estructuras tan definidas. A muy baja fuerza iónica se aprecian además di

ferencias en cuanto a los puntos de entrada y salida del DNA internucleosomal en la sucesión de "cores" del nucleofilamento. Estos puntos se encuentran localizados en lugares opuestos en la cromatina sin H1 (H5) y en zonas próximas (dando lugar a un zig-zag) en el caso de cromatina completa. (veasé Fig. 10)

Según Butler y Thoma (1980) el logaritmo del coeficiente de sedimentación guarda relación lineal con el logaritmo de la fuerza iónica en el intervalo de 5 a 125 mM para fragmentos de 6 a 30 nucleosomas. En fragmentos menores de 6 nucleosomas, la citada relación sólo se obtiene en el intervalo de 5 a 25 mM. Los experimentos de Strätling (1979) con tri y tetranucleosomas indican también en este mismo intervalo una transición cooperativa de una conformación extendida a otra más compacta. Por encima de 20 mM se produce la agregación de las distintas cadenas nucleosomales cortas mediada por la histona H1, dicha agregación no es cooperativa y se produce a una fuerza iónica de 70 mM (Campbell y Cotter, 1977). El comportamiento diferencial de los fragmentos inferiores y superiores a 6 nucleosomas parece indicar que es éste el número de subunidades necesarias para la obtención de mayores órdenes estructurales.

Por otra parte, los fragmentos superiores a 30 nucleosomas, tienen una variación brusca de sus coeficientes de sedimentación entre 45 y 55 mM, existiendo un tamaño crítico de 50 nucleosomas para dicha transición. Esto sugiere una estabilización cooperativa de la estructura solenoidal en dicho intervalo, de modo que por debajo de 45 mM la atracción entre giros adyacentes del solenoide no es lo suficientemente fuerte como para permitir una conforma-

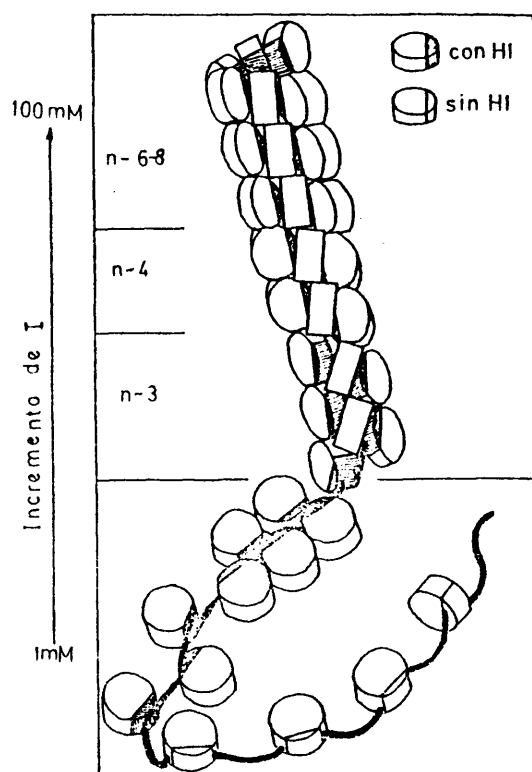


Fig. 10.- Modelo idealizado para las superestructuras helicoidales de la cromatina con H1 y las transiciones estructurales como consecuencia del aumento de la fuerza iónica. (Thoma y col., 1979)

ción estable. El tamaño crítico de 50 nucleosomas, corresponde aproximadamente a 8 vueltas de un solenoide con 6 nucleosomas por vuelta y puede indicar que es ésta la longitud necesaria para una adecuada estabilización axial de la estructura.

1.4.- Los enzimas proteolíticos en el estudio estructural de la cromatina.

Es un principio establecido que la integridad estructural de la cromatina depende de dos tipos de interacciones: histona-histona e histona-DNA. Dichas interacciones pueden verse modificadas mediante la proteólisis parcial de las histonas, introduciendo perturbaciones estructurales a partir de las cuales es posible sacar información acerca de la estructura intacta.

Las primeras investigaciones acerca de las propiedades de la nucleo-histona tratada con tripsina se deben a Cohen (1945) y posteriormente, siguiendo la misma línea de trabajo a Marks y Schumker (1968). Estos encontraron que el tratamiento de la cromatina con tripsina daba lugar a un material compuesto por un 70% de DNA y un 30% de proteína: el complejo resultó ser soluble en ClNa 0,2 M, fuerza iónica en la cual la cromatina nativa posee un mínimo de solubilidad. Por medio de la hidrólisis triptica, la cuarta parte del material proteico original se transformó en peptidos pequeños capaces de difundir a través de los poros de las membranas de diálisis; el 50% de los peptidos resultaron no difusibles y la cuarta parte restante se encontraban asociados al DNA. Estos últimos eran capaces de mantener, en cierto grado, la helicidad del DNA,

como demostraron los estudios hidrodinámicos: las dimensiones del DNA en el hidrolizado resultaron menores que las del DNA libre obtenido a partir de aquel.

Simpson (1972) determinó que el número de enlaces peptídicos rotos por el enzima eran 55 por cada 100 p.b. de DNA. Este número es equivalente a la suma de lisinas y argininas accesibles en la cromatina intacta y que pueden ser fácilmente tituladas o modificadas con anhídrido acético. De este modo, solo resultan susceptibles a la Tripsina el 25-30% de los enlaces potenciales.

Simpson encontró en la cromatina tripsinizada aproximadamente un 50% de peptidos fuertemente unidos al DNA; éstos péptidos parecían ocupar las mismas posiciones que antes del tratamiento, no observándose deslizamiento o redistribución a lo largo del DNA. Los estudios hidrodinámicos y físicos de la cromatina residual indicaron el aumento de su relación axial producido por una cierta relajación de la superhélice del DNA.

La protección ante la tripsina del 70-75% de los enlaces se atribuyó a la interacción de la lisina o arginina implicada en dicho enlace con un fosfato de la cadena del DNA. Esto permitía pensar que el rendimiento obtenido de cada peptido podía dar cuenta de la mayor o menor afinidad de unión del aminoácido básico al DNA y, en cierto modo, indicar los segmentos de unión de las histonas al mismo.

Kato e Iwai (1977) hidrolizaron con tripsina cromatina sin H1 y aislaron alrededor de 50 péptidos de la cromatina residual; observaron que la mayoría de ellos pertenecían a las zonas N-termini

nales, de las histonas, siendo muchos de ellos solapantes como consecuencia de rotura incompleta de muchos enlaces. Alguno de los péptidos provenían de las zonas C-terminales y, en general, no se aislaron péptidos de las regiones centrales. Todo ello se interpretó como reflejo de la unión preferente de las histonas al DNA por sus zonas básicas N-terminales, actuando también de modo secundario las porciones C-terminales en dicha unión.

El estudio de los péptidos presentes en límites de digestión tripticos de cromatina mediante marcaje previo de tirosinas y electroforésis bidimensional (Weintraub y col., 1975) y mediante análisis de aminoácidos (Whitlock y Simpson, 1977) ha permitido establecer que las zonas centrales y C-terminales de las histonas son relativamente resistentes en la cromatina al ataque proteolítico, hidrolizándose entre 23 y 42 residuos de las zonas C-terminales (Whitlock y Simpson, 1977).

Los péptidos límites producidos en núcleos de polen de cicadácea por una proteasa endógena han sido identificados mediante secuenciación como las zonas 24-135 de la H3 y 17-102 de la H4 (Brandt y col., 1975). También se ha identificado el límite triptico de la histona H2A, mediante digestión de núcleos de eritrocitos de pollo como la zona 12-118 de la molécula. Estas zonas resistentes se corresponden con los segmentos mas conservativos de la secuencia de estas histonas.

La resistencia triptica de los 70-90 residuos de la parte C-terminal de las histonas internas es debida a interacciones específicas inter o intramoleculares. Si se digiere cromatina con tripsina en presencia de Urea 6M, no se obtienen fragmentos resistentes y todas las histonas resultan degradadas a pequeños péptidos. Por otra parte, si se disocian las histonas del DNA con ClNa 2M, y se someten a tratamiento triptico a esta misma concentración salina, se obtienen los mismos fragmentos límite que en el caso de cromatina, aunque la velocidad de hidrólisis es mayor. El DNA o la

sal parecen actuar como polielectrolitos disminuyendo las fuerzas repulsivas de las zonas cargadas N-terminales de las histonas que, de otro modo, distorsionan su conformación haciéndolas completamente susceptibles en disoluciones de baja concentración salina al enzima (Weintraub y col., 1975).

El estudio de las velocidades relativas de hidrólisis de las distintas fracciones de histona en núcleos, cromatina o nucleosomas ha permitido obtener una idea aproximada de sus posiciones en la estructura nucleosomal.

Las histonas H1 y H5 son las que se degradan con mayor velocidad, seguidas por la histona H3 (Catterjee y Walker, 1973; Sollner-Webb y col., 1976; Mark y Keller, 1976 y 1977; Lilley y Tactchell, 1977). En cuanto a las velocidades relativas de las demás fracciones, Sollner-Webb y col. (1977) y Catterjee y Walker (1973) encuentran la misma velocidad de hidrólisis de las histonas H2A, H2B y H4 en cromatina. Mark y Keller (1976 y 1977) observan una mayor resistencia de la histona H2A con respecto a las otras dos, también en cromatina y Lilley y Tactchell (1977) obtienen una mayor resistencia de la histona H2B en partículas core.

Los métodos utilizados en el proceso de obtención de la cromatina pueden alterar la susceptibilidad de las histonas al ataque proteolítico; la utilización de fuerzas de cizalla en tampones de baja fuerza iónica posiblemente ocasione la pérdida de estructura nativa de la cromatina debido a cierta redistribución de las histonas (Noll y col., 1975). La velocidad de hidrólisis de la histona H2B es mayor en cromatina solubilizada empleando fuerzas de ci

zalla que cuando se utilizan procedimientos enzimáticos de solubilización (Noll y col., 1975).

La velocidad relativa de hidrólisis de las histonas en núcleos y en cromatina es análoga, excepto un ligero descenso observable para la fracción H4 en núcleos (Sollner-Webb y col., 1976). Los datos obtenidos parecen indicar que en los momentos iniciales del proceso de digestión triptica sólo se encuentran puntos accesibles al enzima en las histonas H1, H5 y H3; en el resto de las histonas éstos sitios accesibles se crearían después de la proteólisis parcial de aquellas (Catterjee y Walker, 1973).

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, son visibles cinco péptidos en el transcurso del proceso de digestión. Estos péptidos han sido identificados por Weintraub y col. (1974) y asignados a sus histonas de procedencia (Fig. 11).

Sahasrabudde y Van Holde (1974) observan que la digestión triptica de partículas core provoca un cambio de conformación de éstas que se caracteriza por un gran descenso de su coeficiente de sedimentación, la disminución de su temperatura de fusión y el aumento de su elipticidad molar a 280 nm. Lilley y Tatchell (1977) estudiaron con más detalle la desestructuración de los cores nucleosomales inducida por hidrólisis triptica. Para ello trataron con cantidades crecientes de enzima partículas core a baja temperatura; de este modo obtuvieron poblaciones homogéneas de partículas en distinto estado de digestión. El análisis de sus coeficientes de sedimentación, resistencia térmica, dicroísmo circular en

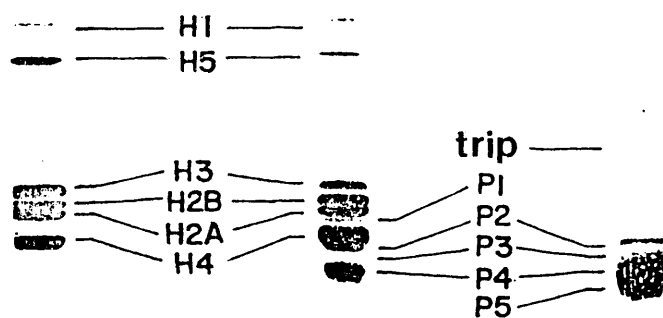


Fig. 11.- Electroforésis en geles de poliacrilamida, método de Laemmli (1970) modificado por Weintraub y col. (1975)

A - cromatina intacta

B - cromatina digerida con tripsina 30 minutos a 37°C

C - cromatina digerida con tripsina en las mismas condiciones utilizando una relación enzima/sustrato mayor.

(Weintraub y col., 1975)

la zona 260-300 nm y resistencia a DNasa I y nucleasa micrococcal, indicó que el cambio conformacional inducido por proteólisis implica una cierta separación de los extremos del DNA de los extremos del núcleo proteico. El DNA de la zona central parece seguir estructurado del mismo modo que en las partículas nativas siendo los segmentos C-terminales resistentes de la histona capaces de mantener dicha conformación.

Los experimentos de Whitlock y Stein (1978) apoyan esta hipótesis; la reasociación de DNA de 140 p.b. con histonas en las cuales se había eliminado previamente las zonas N-terminales dió lugar a complejos nucleoproteicos cuyo coeficiente de sedimentación espectrode D.C. y sensibilidad a DNasa I indicaba que las zonas C-terminales eran capaces por sí mismas de condensar el DNA de modo análogo a como se encuentra en la partícula intacta.

Por otra parte, las zonas C-terminales de las histonas no parecen cambiar de conformación durante el transcurso de la díges-tión tróptica.

Wong y Candido (1978) han comprobado que el grupo sulfhidri-lo de la cisteína 110 de la histona H3 no modifica sustancialmen-te su reactividad durante la proteólisis de los nucleosomas.

Las zonas N-terminales de las histonas parecen tener cierta función, por otra parte, en la estructuración del DNA internucleo-somal ya que en la cromatina tripsinizada el DNA internucleosomal se vuelve más accesible a endonucleasas (Pospelov y col., 1979).

1.5.- Dirección de la investigación realizada.

Como se desprende de lo mencionado en el apartado anterior, la digestión triptica de cromatina o nucleosomas ha aportado datos muy valiosos en el estudio de la estructura del material genético. Este tipo de experimentación ha contribuido a poner de manifiesto los distintos dominios estructurales de cada una de las fracciones de histonas. De este modo, las zonas N-terminales de las histonas internas constituyen el lugar primario de unión de éstas proteínas al DNA y dicha unión se efectúa preferentemente con el DNA de los extremos del core nucleosomal y con el DNA internucleosomal. Las zonas centrales y C-terminales interaccionan con el DNA central del nucleosoma y mantienen su estructura característica gracias al establecimiento entre ellas de interacciones inter e intramoleculares.

Los estudios proteolíticos han evidenciado también diferencias en la funcionalidad de las distintas fracciones de histonas en el mantenimiento de la estructura nucleosomal, adjudicándose a las histonas ricas en arginina un papel central en el desarrollo de ésta función.

También se ha obtenido cierta información acerca de la localización de las histonas en el nucleosoma según su susceptibilidad relativa al ataque enzimático.

No obstante, a pesar de los datos obtenidos hasta el momento, quedan aún muchos aspectos sin esclarecer.

Por una parte, es muy poco lo que se sabe desde el punto de vista cinético de las particularidades del proceso, desconociendo

se los parámetros que lo caracterizan; éstos parámetros es de esperar que se modifiquen al alterar las condiciones del medio, ya que éstas afectan a la estructura de la cromatina, de modo que la realización de un estudio sistemático bajo éste punto de vista podría aportar mucha información.

Por otra parte, los datos obtenidos hasta la fecha son muy fragmentarios, y los fenómenos que acompañan al proceso de digestión trípica de cromatina, tales como la desestructuración del DNA que se pone de manifiesto por el aumento de su elipticidad molecular a 282 nm; la sensibilidad del DNA a nucleasas en distintas etapas del proceso; las alteraciones producidas en el perfil de fusión como consecuencia de la proteólisis, y muchos otros aspectos más, están todavía sin caracterizar. La mayoría de los datos que se han obtenido hasta la fecha sobre la alteración de estos parámetros provienen de la digestión trípica de "cores nucleosomales" (Lilley y Tactchell, 1977), pero es muy poco lo que hecho en digestiones trípicas de cromatina.

En el presente trabajo se han tratado de despejar algunas de estos interrogantes. Para ello se han realizado digestiones trípicas en distintas condiciones de fuerza iónica, temperatura y relación enzima/sustrato. En dichas incubaciones se ha estudiado la cinética de rotura de enlaces, la cinética de desestructuración del DNA que se produce como consecuencia, el orden secuencial de hidrólisis de las histonas y la aparición de sus péptidos.

El material de estudio utilizado ha sido cromatina de eritrocito de pollo que presenta, por una parte, la ventaja de ser un material ampliamente estudiado del que existen muchos datos en la

bibliografía, a cuya luz resulta más correcta la interpretación de los resultados; por otra parte, la cromatina de eritrocito de pollo carece prácticamente de proteasas endógenas que podrían complicar el curso de los experimentos, y, por último, se encuentran en éste material presentes dos histonas ricas en lisina: H1 y H5, ambas relacionadas con los niveles superiores de organización de fibra cromosomal, por lo que resulta especialmente adecuado en los experimentos llevados a cabo introduciendo como variable la fuerza iónica. Estos experimentos se han realizado en paralelo en cromatina nativa y desprovista de histonas H1 y H5 para poder analizar mejor el papel desarrollado por estas histonas.

15

MATERIALES Y METODOS

2.1. Aislamiento de núcleos

En líneas generales se obtuvieron los núcleos según el método descrito por Weintraub y col., 1975.

Se recogió la sangre de pollos adultos recién sacrificados sobre un volumen igual de SSC (ClNa, 0,14 M; Tris·ClH 0,01 M y citrato sódico 0,015 a pH = 7,1), conservándola en frío.

Se centrifugó en una centrífuga SORVALL RC-5 con el rotor SS-34 a 500 g durante 10 min; el sedimento resultante se resuspendió suavemente en el mismo medio y se centrifugó en las mismas condiciones. Esta operación se repitió por dos veces y al sedimento obtenido se le añadieron cuatro volúmenes de ClNa 0,01 M; Cl_2Mg 0,005M; Tris ClH 0,01 M y Nonidet P.40 0,5% a pH=7,4; se mantuvo durante 90 min con agitación magnética suave en este medio. El Nonidet P.40 disuelve las membranas celulares pero no las nucleares; a continuación se centrifugó a 500 g durante 8 min, el sobrenadante se descartó y el sedimento, en el que se encuentran los núcleos, se lavó 4 ó 5 veces con el mismo medio hasta obtener un sobrenadante claro.

Todas estas operaciones se realizaron a baja temperatura (0-4°C). Cuando se deseó conservar los núcleos obtenidos durante períodos de tiempo prolongados, se resuspendieron en Cl_2Mg 2 mM; Tris·ClH 5 mM y glicerol 66% a pH= 7.5 en una proporción de 4×10^9 núcleos/ml y se almacenaron en un congelador a -70°C.

El conteo de núcleos se efectuó con una cámara de recuento Neubauer-Tiefe 0,100 mm, efectuándose las diluciones oportunas con una pipeta Thoma.

2.2. Obtención de cromatina soluble

El método empleado para solubilizar cromatina directamente a partir de núcleos, fué el de incubar suavemente éstos con nucleasa micrococal.

Este procedimiento de solubilización por fragmentación enzimática tiene la ventaja, sobre aquellos que utilizan la fragmentación mecánica, de preservar mejor la estructura de la cromatina. Está descrito que los métodos mecánicos pueden ocasionar modificaciones estructurales que se pueden poner de manifiesto por una diferente sensibilidad del material obtenido a nucleasas y proteasas (Noll y col., 1975).

El procedimiento seguido se describe a continuación. Se añadieron 15 volúmenes de sacarosa 0,2M; Cl_2Ca 1mM; Tris.ClH 5mM y ClNa 60mM a pH=7.5 a la suspensión de 4×10^9 núcleos/ml obtenida como se indica en el apartado anterior, una vez atemperada ésta a 4°C. Después de 30 min de agitación magnética suave se centrifugó en centrífuga SORVALL RC-5 con rotor SS-34 a 500 g durante 8 min. El sedimento se lavó dos veces con el mismo medio y después del último lavado, se procedió a su recuento y se preparó una suspensión de $2,5 \times 10^8$ núcleos/ml. Esta suspensión se atemperó a 37°C y seguidamente se añadieron 15 unidades (1) de nucleasa de S.aureus (E.C. 3.1.4.7.) por ml de suspensión. Se agi-

(1) Una unidad equivale a 1/85 unidades μ molares de actividad. Una unidad μ molar se define como la producción de 1.0 μ moles de polinucleótidos solubles en ácido a partir del DNA por min a 37°C y pH=8.8, utilizando un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{260} = 10.000$ para la mezcla de nucleótidos.

tó durante 30 seg a esa temperatura y se añadió a continuación un volúmen igual de EDTA 5mM; Tris.ClH 5mM y ClNa 60mM a pH=7.50 frío. El EDTA presente en éste medio detiene la acción enzimática. Después de mantener en frío la suspensión durante 60 min se centrifugó a 300 g 60 min y el sobrenadante obtenido, en el que se encuentran los fragmentos grandes de cromatina en forma soluble, se dializó frente a 2 l de Tris.ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 cambiándose tres veces el medio de diálisis.

2.3. Extracción selectiva de histonas H1 y H5 de cromatina soluble.

2.3.1. Disociación salina

La cromatina soluble obtenida como se indica en el apartado 2.2. y dializada frente a Tris.ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0, se depositó en una célula de ultrafiltración modelo UF52 provista de una membrana de diálisis (PM 10, 62 mm Ø) hasta conseguir una concentración de DNA de 0,5 mg/ml. La disolución se llevó hasta una concentración final de ClNa de 0,65 M mediante adición de una disolución concentrada de ClNa gota a gota y con agitación. Después de 18h de agitación suave a 4°C, se separó el material disociado del complejo nucleoproteico no disociado por cromatografía en columna (37 x 2,6 cm) de CL-Sepharose 6B. Se eluyó con ClNa 0,65M, Tris.ClH 5mM, EDTA 1mM y PMSF 0,2mM a pH=8.0; la velocidad de flujo se ajustó a 0,6 ml/min y se recogieron fracciones de 5 ml.

En el eluido se midieron las absorbancias a 260 y 230 nm frente a un blanco formado por la solución de eluido.

2.3.2. Tratamiento con resina de intercambio catiónico

Se dializó la cromatina soluble frente a fosfato sódico 50mM, EDTA 0,2mM y ClNa 100mM a pH=7.0. Se añadió a continuación 1/4 del volúmen inicial de resina Dowex 50 W x 8 (50/100 mesh) Fluka equilibrada en el medio de diálisis. Después de 90 min de agitación a 4°C se centrifugó a 500 g 5 min y se repitió con el sobrenadante la misma operación. Una vez eliminada de nuevo la resina por centrifugación, se dializó el material obtenido frente a Tris ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0.

2.3.3. Método del ácido cítrico

Los núcleos de eritrocito se suspendieron en un medio que contenía sacarosa 0,25M, ClK 25mM, Cl₂Ca 1mM, Cl₂Mg 1mM, ac. cítrico 0,1M y fosfato sódico 0,2M a pH=3.0 (Lawson y Cole, 1979). Se mantuvieron durante 15 min con agitación suave a 4°C; seguidamente se centrifugó a 300 g. 8 min y el sedimento obtenido se volvió a extraer con el mismo medio en las mismas condiciones. El sedimento resultante se lavó 5 ó 6 veces con sacarosa 0,2M, Cl₂Ca 1mM, Tris.ClH 5mM y ClNa 60mM a pH=7,5 preparándose una suspensión de $2,5 \times 10^8$ núcleos/ml. Esta suspensión se trató con nucleasa de micrococo (E.C. 3.1.4.7.) en las condiciones descritas en el apartado 2.2. con objeto de solubilizar la cromatina desprovista de histonas H1 y H5.

Una variante utilizada de éste método fué la propuesta por Ring y Cole (1979).

El procedimiento seguido consistió en suspender los núcleos en sacarosa 0,25M, Tris.ClH 0,01M, SO_3HNa 0,05M, Cl_2Mg 0,01M y PMSF 0,25mM a pH=8.0, añadiendo ácido cítrico concentrado gota a gota y con agitación rápida hasta llegar a pH=3.0. A continuación se centrifugó a 300 g durante 8 min y el sedimento obtenido se extrajo dos veces con tampón ac. cítrico-fosfato 50mM, sacarosa 0,25M, ClK 25mM, Cl_2Mg 1mM Cl_2Ca 1mM a pH=2,1; se mantuvo a 4°C durante 3h con agitación y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones.

Los núcleos se suspendieron finalmente en sacarosa 0,2M, Cl_2Ca 1mM, Tris.ClH 5mM y ClNa 60mM a pH=7.5 y se lavaron 5 ó 6 veces con este medio, el proceso se continuó del mismo modo que en el caso anterior.

2.4. Extracción de histonas

A partir de 100 ml de sangre se aislaron los núcleos por el procedimiento indicado en el apartado 2.1. Se resuspendieron los núcleos con EDTA 1mM a pH=7.0 y se sometieron a agitación magnética durante 3h a 4°C. Con éste tratamiento se obtuvo un gel viscoso que correspondía a la cromatina; se centrifugó a continuación a 3000 g, 30 min y el sedimento resultante se homogeneizó en un homogeneizador de aspas Omni-Mixer Sorvall durante 5 min en PCA 5% (1/2 p:v).

El PCA 5% tiene como efecto solubilizar de la cromatina las histonas H1 y H5, así como otro pequeño número de proteínas cromosomales no histonas, principalmente las denominadas HMG, quedando insolubles el DNA y las histonas nucleosomales internas; el material insoluble se separó por centrifugación a 3000 g, 30 min

y el sedimento obtenido se extrajo con cuatro volúmenes de ClH 0,25 N durante 20 h con agitación a 4°C. Seguidamente se centrifugó a 20.000 g 10 min y se lavó el sedimento con acetona.ClH; se lavó otras dos veces el sedimento con acetona y se secó finalmente a vacío.

El sobrenadante de la extracción con PCA 5%, se filtró por placa de vidrio filtrante de poro nº 4 y el filtrado se llevó a ClH 0,3 N mediante adición de ClH concentrado con agitación fuerte. A continuación se añadieron 3 volúmenes de acetona rápidamente y con agitación y se tuvo 12h a 4°C, después se centrifugó a 3000 rpm, 30 min y el sedimento obtenido se lavó cuatro veces con acetona y se secó a vacío.

2.5. Incubación con nucleasa de micrococo

La cromatina se suspendió en tampón sacarosa 0,3 M, Cl₂Ca 1mM Tris.ClH 5mM a pH=7.3 a una concentración de 0,25 mg/ml de DNA; la disolución se atemperó a 37°C y, a continuación, se añadió nucleasa de micrococo (E.C. 3.1.4.7.) (Sigma) en una proporción de 40 unidades de enzima por cada mg de DNA . La incubación de las muestras se realizó durante diferentes periodos de tiempo comprendidos entre 1 y 40 minutos.

La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA 0,1 M hasta llevar la disolución a una concentración de 5mM; se congelaron las muestras en aire líquido y se liofilizaron; posteriormente se disolvieron a una concentración de 1mg/ml en el disolvente indicado en el apartado 2.11.1.2.

2.6. Incubación con desoxirribonucleasa I

Se utilizó como tampón de incubación Tris.ClH 10mM y Cl_2Mg 3mM a pH=7.9. La cromatina se atemperó a 37°C en dicho tampón, añadiéndose el enzima (E.C. 3.1.4.5.) (Sigma) en una proporción (1) de 80 unidades Kunitz por mg de DNA presente.

Transcurridos 2 min desde la adición del enzima se añadió EDTA hasta alcanzar una concentración final de 10 mM y se enfrió en agua de hielo. A continuación se tuvo 1 min. al baño maria a 100°C y se enfrió rápidamente en agua de hielo.

El digerido desnaturalizado se atemperó a 37°C, se añadió proteasa pancreática (Sigma) hasta una proporción en peso respecto al DNA de 1/25 y se incubó durante 4h. a 37°C con agitación. El hidrolizado se llevó hasta una concentración de ClNa de 0,2M y se precipitó con 2 volúmenes de etanol 95% en frío. El precipitado se separó por centrifugación y se lavó dos veces con etanol 70%, se secó a vacío y se disolvió a una concentración de 1mg/ml de DNA en formamida 98%-glicerol 5% conservándose en frío.

2.7. Incubaciones con Tripsina

Se tomó una disolución de cromatina (0,25 mg de DNA/ml) en medio tamponado, atemperándose, según los casos, a 4, 13 ó 26°C;

(1) Una unidad Kunitz de actividad se define como un incremento en la absorción a 260 nm de 0,001 por minuto y por ml al digerir con el enzima DNA a pH=5.0 y 25°C

se añadió a continuación un volumen determinado de una disolución de Tripsina (E.C. 3.4.21.4.) tratada con DPCC (Sigma) en $\text{ClH } 10^{-3}\text{N}$ para conseguir la relación enzima/DNA deseada (1/1000; 1/600 ó 1/300).

En el transcurso de la incubación se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se sometieron al siguiente proceso:

- Se añadió, con agitación un volumen determinado de una disolución de inhibidor de tripsina (de soja, tipo 1-S) (Sigma) en agua, para conseguir una relación en peso con respecto a la cantidad de tripsina presente en la alícuota de 6 a 1.
- Se hicieron, a continuación tres partes:
 - a) 1/7 del volumen se diluyó con el mismo medio de incubación 5 veces.
 - b) 3/7 del volumen se llevaron a una concentración final de Cl_2Mg de 3mM, mediante la adición de un volumen determinado de una disolución concentrada de Cl_2Mg .
 - c) los 3/7 restantes se reservaron sin modificar.
- Las tres partes (a, b y c) se atemperaron durante 2 minutos en baño regulado a 37°C.
- A la parte b se le añadieron 80 unidades Kunitz por mg de DNA de desoxirribonucleasa I (E.C. 3.1.4.5.).
- Se incubaron las tres partes durante 2 minutos a la misma temperatura.
- Se añadió a la parte b un volumen determinado de EDTA en solución concentrada hasta llevarla a una concentración final de 10 mM.

- La parte c se congeló inmediatamente en aire líquido y se liofilizó, disolviéndose después en el disolvente de muestras de la electroforesis de histonas (apartado 2.11.1.1.)
- Con la parte a se registró un espectro de dicroísmo circular (apartado 2.11.4.).
- La parte b se desnaturalizó durante 1 min en baño de agua a 100°C y se sometió a los procesos ya indicados en el apartado 2.6.

En los experimentos en que no se hizo incubación con desoxirribonucleasa I, se prescindió de la parte b, y con las partes a y c se operó del mismo modo exceptuando las incubaciones a 37°C que no se realizaron.

2.8. Determinación de la actividad de la tripsina

La realización de incubaciones tripticas de cromatina a diferentes temperaturas y condiciones de fuerza iónica, planteó la conveniencia de estudiar las modificaciones inducidas por tales variables en la actividad de la enzima, para poder así adquirir un criterio aproximado de homologación de los distintos experimentos.

2.8.1. Influencia de la temperatura

Se preparó una solución 1mM de sustrato BAPNA (Sigma) en Tris ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0; de esta solución se hicieron tres partes iguales que se atemperaron a 4, 13 y 26°C en baños

termostatizados; a cada parte se añadió tripsina tratada con DPCC (Sigma) disuelta en ClH 10^{-3} N, hasta obtener una relación 1/200 en peso con respecto al sustrato.

A distintos tiempos se tomaron alícuotas que se introdujeron inmediatamente en agua de hielo; a cada una de ellas se le añadió inhibidor de tripsina (de soja tipo 1-S) (Sigma) hasta obtener una proporción en peso 6 veces mayor que la cantidad de tripsina presente en la alícuota. Seguidamente se midió la absorbancia a 405 nm de cada uno de los hidrolizados frente a un blanco formado por la disolución de sustrato.

2.8.2. Influencia de la fuerza iónica

Se preparó una disolución 2mM de sustrato BAPNA (Sigma) en Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0; de ésta disolución se tomaron alícuotas que se llevaron a la fuerza iónica deseada mediante la adición de un volumen igual de disoluciones con distinta concentración de ClNa en Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0; a continuación se añadió el enzima en proporción 1/200 en peso con respecto al sustrato y se comenzó a registrar el incremento de absorbancia a 405 nm por minuto.

En los primeros momentos del ensayo, el incremento de absorbancia guarda relación lineal con el tiempo. La pendiente de la recta obtenida da la velocidad inicial de reacción.

Como en todos los casos la relación enzima/sustrato y la concentración de sustrato es la misma, la relación de velocidades a las distintas fuerzas iónicas ensayadas es la misma que la relación de constantes de reacción.

2.9. Cinéticas de titulación automática

La cinética de rotura de enlaces en digestiones tripticas de cromatina o histonas se estudió mediante titulación automática empleando NaOH 4,5mM.

Se utilizó un equipo Radiometer provisto de un titulador tipo TTT1c, una auto-bureta tipo AB1 1b con bureta 150 de 2,5 ml de capacidad y un registro tipo SBR 2c.

El pH se fijó en 7.95 y la velocidad de liberación de NaOH nunca fué superior al 0,5-1% del volúmen total de la bureta por minuto.

La disolución de la muestra sin tamponar se situó en un vaso con doble pared conectado a un baño termoregulado ajustado a 26°C; durante todo el proceso se comprobó que no se produjeron variaciones en la temperatura mediante la instalación en la solución de un termopar cobre-constantan previamente calibrado (Fig. 12) y conectado a un registro.

Antes de añadir el enzima se desgasificó la muestra bajo vacío durante 45 minutos y se gaseó N₂ para expulsar el CO₂ disuelto y durante todo el desarrollo de la titulación se hizo pasar a través de la disolución de muestra un flujo constante de N₂ (5,6 l/h) para evitar errores de titulación de CO₂.

La tripsina se añadió disuelta en ClH 10⁻³ N en una proporción 1/300 en peso respecto a la concentración de sustrato; en todos los casos se efectuó la corrección oportuna para descontar la valoración del ClH añadido.

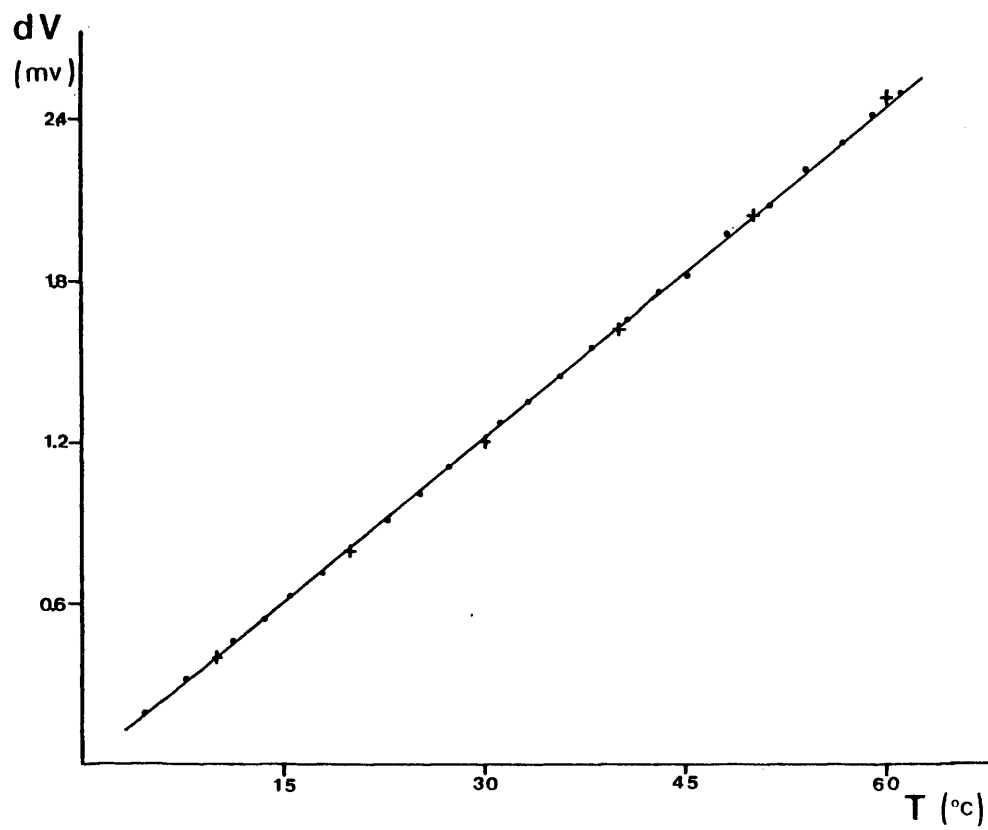


Fig. 12.- Recta de calibrado del termopar cobre-constantan.

+ datos tomados del Handbook of Chemistry and Physics

(pág. E-109)

. puntos experimentales

2.10. Cinéticas de digestión triptica de cromatina seguidas por
D.C. a 282 nm

Se utilizó un dicrógrafo Jobin Yvon modelo Mark III. Las ci
néticas se realizaron a la temperatura de 26°C; el bloque en que
descansa la célula se ajustó a dicha temperatura mediante su co-
nexión a un baño termostatzado. Las oscilaciones de temperatura
se controlaron en todo momento por medio de un termopar cobre-cons-
tantan; de sus dos extremos, uno de ellos se instaló en el cuello
de la célula y el otro se mantuvo en agua de hielo. Un registro
gráfico acoplado al sistema indicó las pequeñas fluctuaciones,
nunca superiores a $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

En todos los experimentos, el medio de disolución de la cro
matina fué Tris-ClH 5mM, EDTA 1mM a pH=8.0, variando únicamente
de un experimento a otro la concentración de ClNa en un intervalo
de 0 a 100 mM; la absorbancia a 258 nm de la muestra se ajustó
siempre a 1.40, que corresponde a una concentración de 70 μg de
DNA/ml; el volúmen introducido en la célula, que poseía un paso
óptico de 1 cm, fue de 2,95 ml.

Una vez introducida la muestra en la célula se dejó atempe-
rar el tiempo suficiente hasta alcanzar la temperatura indicada
y seguidamente se registró un espectro en la zona de 255 a 330 nm
utilizando una sensibilidad de 2×10^{-6} y una cte de tiempo de 5
sg. A continuación se fijó la longitud de onda en 282 nm, se ajus
tó la constante de tiempo y la velocidad de registro a 20 sg y
1,5 mm/min respectivamente y se registró línea base durante 10 mi
nutos.

Seguidamente se añadió el enzima. En la mayoría de los casos
la relación enzima/DNA empleada fue 1/25, por lo que se añadieron

12 μ l de una disolución de tripsina en ClH 10^{-3} N de concentración 0,7 mg/ml. En las ocasiones en que se utilizó una relación enzima/DNA distinta, se prepararon disoluciones de enzima mas o menos concentradas pero el volumen de disolución añadido fue el mismo.

2.11. Métodos analíticos

2.11.1. Electroforesis

2.11.1.1. Electroforésis de histonas.

Se siguió el método de Laemmli, 1970 con las modificaciones introducidas por Lestourgeon, 1973.

En este método el gel consta de dos capas de concentraciones de acrilamida distintas: la superior, del 3%, se usa como gel de concentración, y la inferior, del 15%, como gel de separación.

La polimerización se realizó entre dos placas de vidrio de 160 x 170 mm y las mezclas de polimerización se prepararon como se describe a continuación:

- gel inferior: se mezclaron dos volúmenes de disolución A (Acrilamida al 30%; bisacrilamida 0,8% a pH=8,8), 1 volumen de B (SDS 0,4%; Tris-ClH 1,5M a pH=8,8) y un volumen de agua. Esta mezcla se desgasificó y se adicionaron 0,002 volúmenes de TEMED y 0,016 volúmenes de disolución D (per sulfato amónico al 10% en agua).
- se llenaron las placas, previamente selladas con cantos de 1,5mm de espesor dejando 4 cm en la parte superior que se recubrieron con agua cuidadosamente con el fin de conseguir una superficie de polimerización horizontal. Una vez

realizada la polimerización, se eliminó el agua de la sobrecapa y se añadió el gel superior.

- gel superior: se mezclaron 1,5 volúmenes de disolución A; 2,5 volúmenes de C (SDS 0,4%; Tris-ClH 0,5M a pH=6,8) y 6 volúmenes de agua destilada. Después de desgasificar, se añadieron 0,01 volúmenes de TEMED y 0,04 volúmenes de disolución D. Antes de que se polimerizase este gel se introdujo una pieza en forma de peine que dá lugar a los pocillos de aplicación.

Para preparar las muestras se empleó como disolvente glicerina al 10%, SDS al 3% y Tris-ClH 60mM a pH=6,8, empleándose una concentración aproximada de 1 mg/ml. Las muestras se incubaron a 100°C en baño María durante 10 min, con objeto de conseguir la fijación del SDS a las proteínas. La aplicación en los pocillos se efectuó con microjeringa; en los pocillos de los extremos se aplicó siempre Azul de Bromofenol (0,001%) que se utilizó como marcador, ya que, debido a su bajo peso molecular, posee una mayor movilidad electroforética que cualquiera de las proteínas presentes en la muestra.

La electroforésis se realizó a intensidad constante (32 mA) durante 5-6 hr hasta que el azul de Bromofenol había alcanzado el borde inferior de la placa.

Para teñir los geles se introdujeron primero en azul Coomassie R-250 al 0,25% en alcohol isopropílico al 0,25% y ácido acético al 10% durante 12-h; transcurrido ese tiempo se mantuvo 6h en azul Coomassie R-250 al 0,025% en alcohol isopropílico al 10%

y ácido acético al 10%; a continuación los geles se introdujeron en azul coomassie al 0,025% en ácido acético al 10% y, después de 6 hr en este medio, se destiñeron con ac. acético al 10%.

En las electroforésis en que fué necesaria una determinación cuantitativa de la intensidad de las bandas aparecidas ó medir de forma exacta sus distancias relativas, se procedió al densitometrado utilizando un densitómetro Canalco, modelo G, con un filtro Wratten de 570 nm.

2.11.1.2. Electroforésis de DNA en condiciones no desnaturalizantes.

Los fragmentos de DNA obtenidos de las muestras digeridas con nucleasa de micrococo se caracterizaron por el método de Peacock y Dingman (1967).

El gel se preparó mezclando volúmenes iguales de dos disoluciones A y B; la disolución A (Tampón Tris-borato 0,18M y EDTA 5mM a pH=8,3 suplementado con acrilamida al 6%, bisacrilamida al 0,30% y TEMED al 0,062%) se desgasificó bajo vacío durante 30 min y se atemperó seguidamente en baño de agua a 40°C; la solución B (agarosa al 1% en agua destilada) se calentó a reflujo hasta conseguir su fusión y se enfrió en baño termorregulado hasta 40°C. Después de mezclar ambas disoluciones se adicionaron 0,01 vol de persulfato amónico al 5% en agua destilada. Las concentraciones finales de acrilamida y agarosa fueron 3 y 0,5% respectivamente.

La mezcla de polimerización se vertió entre dos placas de vidrio de 160 x 170 mm selladas con cantos de 1,5 mm de espesor; los pocillos de aplicación se formaron mediante la introducción de una pieza en forma de peine en el borde superior.

Las muestras se disolvieron en tampón Tris-borato 90mM y EDTA 2,5 mM a pH=8,3 suplementado con sacarosa al 4%, azul de bromofenol al 0,001/ y sarkosil (N-dodecil-sarcosinato sodico) al 0,4% a una concentración de DNA de 1 mg/ml.

Antes de efectuar la electroforésis se realizó una preelectroforésis durante 1 h a una intensidad de 50 mA, utilizando como tampón de desarrollo Tris-borato 90 mM y EDTA 2,5 mM a pH=8,3. Con este tratamiento se eliminan del gel el TEMED y el persulfato utilizados en la polimerización y se evita que éstos iones migren en un frente que perturbe las bandas. La electroforésis se realizó a la misma intensidad durante 3,5 h a una temperatura de 4°C utilizando el mismo tampón de desarrollo.

Para el revelado se utilizaron dos métodos alternativos. Los geles se introdujeron en una disolución de bromuro de etidio (2 µg/ml) en tampón de electroforésis durante 30 min y se lavaron después varias veces con agua destilada, las bandas se visualizaron seguidamente bajo luz U.V. Otro método fué el de sumergir los geles en "stains-all" al 0,05% en tampón de electroforésis durante 12 h y desteñirlos con agua. Todas las operaciones de revelado se realizaron en la oscuridad.

2.11.1.3. Electroforésis de DNA en geles de agarosa

El tamaño de los fragmentos de DNA de la cromatina soluble obtenida por tratamiento suave de núcleos con nucleasa micrococcal se determinó mediante electroforésis en geles de agarosa 0,7%, en los cuales la movilidad es función lineal del logaritmo del peso molecular en fragmentos mayores de 2×10^5 Daltons.

Para preparar el gel, la agarosa (Agarosa tipo I, de Sigma de bajo flujo electroendosmótico) al 0,7% en tampón Tris-ClH 0,04M acetato sódico 0,02M y EDTA 2mM ajustado a pH=7,8 con ácido acético, se calentó hasta ebullición en baño María y se mantuvo así unos minutos; se dejó enfriar hasta 60°C y se vertió en un marco de 27 x 18 cm previamente sellado con dos placas de vidrio. Se dejó enfriar hasta la solidificación y se retiró después con cui dado una de las placas de vidrio. A 2 cm del borde superior del gel se realizaron una serie de incisiones de 1 cm de longitud se paradas entre sí 1,5 cms a lo largo de una línea recta. Se retiró después el marco y se dejó descansar horizontalmente el gel sobre la placa inferior apoyada en sus dos extremos sobre las cubetas con el tampón de desarrollo. Entre las cubetas y el gel se formó puente con papel de filtro empapado en tampón. Todo ello se cubrió con un plástico para impedir que se secase el gel.

Las muestras se prepararon utilizando como disolvente tampón de desarrollo suplementado con sacarosa 5%, azul de Bromofenol 0,001% y Sarkosil (N-dodecil-sarcosinato sódico) 0,4% a una concentración de 2 mg/ml. En esta disolución se empapó una tirita de papel Whatman de 1mm de espesor y 1 cm de longitud. Esta tirita se introdujo en una de las incisiones practicadas en el gel.

La electroforesis se efectuó durante 14 h aplicando una diferencia de potencial de 2 V por cm de gel. El tampón utilizado fué Tris-ClH 0,04 M, acetato sódico 0,02M y EDTA 2mM a pH=7,8; el tipo de desarrollo fué horizontal y todo el proceso se realizó a 4°C para impedir un calentamiento excesivo del gel.

Se empleó para el revelado una disolución de bromuro de etidio (2 µg/ml) en tampón de desarrollo; después de 30 min de man-

tener el gel en dicha disolución, se visualizaron las bandas de DNA con luz ultravioleta.

2.11.1.4. Electroforésis de DNA en condiciones desnaturantes.

Este tipo de electroforésis se utilizó para analizar los fragmentos de DNA resultantes de las incubaciones con DNAsa I.

El método utilizado fué el de Maniatis y col. (1975), en el cual, los geles poseen una concentración de acrilamida del 12% y de urea 7M. En estas condiciones, la movilidad de las moléculas de DNA desnaturizado es función lineal con el logaritmo del peso molecular en el intervalo de tamaños de 10 a 150 nucleótidos.

El gel se preparó mezclando 31,5 g de urea, 30 ml de disolución A (acrilamida 29% y bisacrilamida 1% en agua) y 7,5 ml de Tampón TBE concentrado 10 veces (Tris-borato 0,09 M y EDTA 2,5mM a pH-8,3; Peacock y Dingman, 1967). Se llevó todo ello a 72 ml y se degasificó bajo vacío durante 30 min. A continuación se añadieron 3 ml de una disolución de persulfato amónico en agua al 1,6% y 25 µl de TEMED.

La polimerización se realizó entre dos placas de vidrio selladas de las mismas características que las señaladas en el apartado 2.11.1.1.

Las muestras se disolvieron a una concentración de DNA aproximado de 1 mg/ml en glicerol 5%, formamida 98% y se calentaron durante 2 min a 100°C en baño de agua hirviendo e inmediatamente después se enfriaron en agua de hielo. La cantidad de muestra empleada en cada aplicación osciló entre 15 y 25 µl.

Como marcador electroforético se utilizó azul de bromofenol al 0,001% en el mismo disolvente de muestras; la movilidad de éste marcador en éstas condiciones es análoga a la del fragmento de 10 nucleótidos.

El tipo de desarrollo fué vertical, utilizándose como tampón de electroforésis el tampón TBE. Se aplicó un voltaje de 160 V durante 3,5 h.

Las condiciones de revelado fueron las mismas que las descritas en el apartado 2.11.1.2.

2.11.2. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Se empleó un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20%. La sacarosa estaba disuelta en Tris-ClH 10 mM, EDTA 10mM y PMSF 0,1mM a pH=8,3. Se depositaron sobre el gradiente 500 µl de una disolución de cromatina en Tris-ClH 5mM y EDTA 5mM a pH=8,3 con una concentración de DNA de 210 µg/ml. El volúmen total del gradiente fué de 12 ml y se utilizaron tubos del rotor SW40 (Beckman).

La centrifugación se realizó en una ultracentrífuga SORVALL OTD 2 durante 19 h a 6°C y a una velocidad de 20.000 g.

La lectura de gradientes se efectuó mediante la medida de la absorbancia a 254 nm a una velocidad de 1,5 ml/min con un ISCO Density gradient Fractionator modelo 185. Se utilizó un registro Servograph REC 51 acoplado a un monitor de absorbancia ISCO VA 5.

2.11.3. Espectros de absorción

Los espectros de absorción en la zona del ultravioleta, se realizaron, de modo rutinario, una vez obtenida la cromatina solu

ble y dializada frente al medio correspondiente, con objeto de obtener una primera información acerca de su naturaleza.

Se utilizó un espectrofotómetro Cary 118 y cubetas de 1 cm de paso óptico. Las medidas se realizaron frente a un blanco formado por el medio de disolución de la cromatina. También se realizó siempre un espectro ultravioleta, tanto de cromatina soluble como de los distintos digeridos tripticos, antes de la obtención de los espectros de dicroísmo circular; en éste caso, para estimar la concentración de DNA en la disolución en mg/ml, se tomó un valor de referencia de $A_{1\text{cm}} = 20$ para una concentración de 1 mg/ml.

2.11.4. Espectros de dicroísmo circular

La obtención del espectro de dicroísmo circular de la cromatina soluble fué uno de los criterios utilizados acerca de su estructura. Así mismo, también se registraron los espectros de dicroísmo circular en las incubaciones tripticas realizadas a tiempos discretos como se indica en el apartado 2.7.

Se utilizó un dicrógrafo Jobin Yvon modelo Mark III provisto de una lámpara de Xenon de 250 W. Los espectros se obtuvieron después de diluir las muestras 5 veces con el tampón de solubilización a una absorbancia de 1 a 260 nm. El instrumento se ajustó a una sensibilidad de 2×10^{-6} y la velocidad de barrido fué de 0,2 nm/sg. Las elipticidades se representan como elipticidades molares en grados $\times \text{cm}^2/\text{d mol}$ y se calcularon mediante la expresión

$$\theta = \frac{h \times s \times 342}{C \times L} \times 3.300$$

donde h es la altura en mm en cada punto del espectro, S la sensibilidad, C la concentración en mg/ml, L el paso óptico y 342 el peso molecular medio por nucleótido.

Para cada espectro se registró su línea base usando el mismo medio de disolución de la muestra.

2.11.5. Métodos de análisis de curvas

2.11.5.1. Curvas de titulación automática

Las curvas obtenidas experimentalmente deben reflejar la velocidad promedio de rotura triptica de todos los enlaces peptídicos cuyo grupo carboxilo sea aportado por una lisina o arginina. En el caso de que todos los enlaces sean igualmente accesibles para el enzima y se rompan a la misma velocidad, la curva experimental se ajustará a una reacción de primer orden; estrictamente hablando, la reacción no tiene por qué ser cinéticamente de primer orden, la concentración de enzima, y no sólo la de cromatina, influye en la velocidad de reacción. No obstante pueden determinarse, como se discute más adelante, unas constantes cinéticas de pseudo-primer orden. Estas constantes que dependen de la relación tripsina/DNA son las que se manejarán en lo sucesivo. En el caso de que unos enlaces resulten más accesibles que otros al enzima, se podrán agrupar en clases en las cuales la constante de ruptura sea análoga pero difiera significativamente de las demás; la curva experimental obtenida será la suma de tantas curvas exponenciales como clases distintas de enlaces puedan diferenciarse respecto su accesibilidad al enzima:

$$H_t = \sum_{i=1}^{i=n} H_i (1 - e^{-k_i t}) \quad (1)$$

donde H_t es el n° de μ eq. de NaOH/mg de proteína consumidos a tiempo t , H_i el n° de μ eq. de NaOH/mg de proteína consumidos como consecuencia de la rotura de todos los enlaces de la clase i y k_i la constante de hidrólisis de los enlaces pertenecientes a esta clase.

La obtención de los parámetros individuales a partir de la curva experimental puede realizarse utilizando un método de análisis gráfico o empleando un programa de cálculo adecuado en un ordenador.

2.5.11.1.1. Método de análisis gráfico.

En el caso de que la cinética sea de pseudo-primer orden, la expresión (1) tomaría la forma:

$$H_t = H_1 (1 - e^{-k_1 t})$$

Tomando \ln de esta expresión:

$$\ln (H_1 - H_t) = \ln H_1 - k_1 t$$

Si representamos $\ln (H_1 - H_t)$ frente al tiempo debemos obtener una línea recta cuya pendiente es k_1 y cuya ordenada en el origen es $\ln H_1$. De este modo pueden obtenerse los parámetros de la reacción.

Caso de existir dos clases distintas de enlaces, es de esperar que para los tiempos finales de incubación solo se estén hidrolizando los enlaces más inaccesibles y que los más accesibles, que se hidrolizan con mayor rapidez, ya lo hayan sido. Esto se re

flejará en la representación de $\ln (H_1 - H_t)$ frente al tiempo en que la parte correspondiente a tiempos largos será de tipo lineal. A partir del tramo lineal se pueden obtener los parámetros de la reacción más lenta; si restamos de cada punto correspondiente del tramo curvo, obtenido a tiempos cortos, el valor aportado por el proceso lento y representamos después los logaritmos neperianos de éstas diferencias frente al tiempo, obtendremos una línea recta que nos dará los parámetros correspondientes del proceso rápido. Del mismo modo se operaría en veces sucesivas, de existir más de dos clases distintas de enlaces.

2.11.5.1.2. Análisis mediante programa de cálculo.

Se empleó un programa de regresión no lineal del paquete de programas BMDP, utilizando un ordenador IBM/360-65 I con sistema operativo OS/360.

Este programa utiliza un procedimiento iterativo para buscar la curva teórica que más se aproxima a la experimental de modo que la suma de los residuos, diferencias entre la ordenada de los puntos experimentales (v_o) y los teóricos (v_t), al cuadrado sea mínima; el número máximo de iteraciones programado es de 100, y la iteración seleccionada es aquella en la que se cumple que:

$$\frac{SDC^{(N+1)} - SDC^N}{SDC^{(N+1)}} < 0,0005$$

donde $SDC^{(N+1)}$ y SDC^N son la suma de residuos al cuadrado de todos los puntos en la iteración $N + 1$ y N respectivamente.

Todas las curvas experimentales se ajustaron a curvas teóricas de 4, 3, 2 y 1 exponenciales y, en cada ajuste, se calculó

el valor rms mediante la expresión:

$$rms = \sqrt{\frac{(v_t - v_o)^2}{(v_t)^2}}$$

donde v_t y v_o son los valores de la ordenada de los puntos teóricos y experimentales respectivamente.

Por otra parte, para cada ajuste teórico se obtuvo una representación de los residuos (abscisas) frente a su probabilidad normal (ordenadas). Si en dicha representación se obtiene una nube de puntos que se ajusta a una línea recta el ajuste es bueno, ya que entonces los residuos obtenidos se distribuyen de forma estadística según una distribución normal, lo cual es índice de que dichos residuos tienen su origen en el error experimental y no son producto del método numérico, siendo en éste caso la función de aproximación adecuada.

La probabilidad normal de cada residuo se calculó mediante la expresión:

$$\phi^{-1}\left(\frac{3j - 1}{3N + 1}\right)$$

donde ϕ^{-1} es la función inversa de la función de distribución de la probabilidad normal estandar, j el lugar que ocupa un residuo determinado en la serie ordenada y N el número total de residuos del ajuste. (Dixon y Massey, 1969).

El criterio para la relación del ajuste teórico a 4, 3, 2 ó 1 exponenciales, se realizó, en cada caso, escogiendo aquellos ajustes en los que el valor rms fuese mínimo y en que la representación de los residuos frente a su probabilidad normal se ajustaba más a una línea recta.

2.11.5.2. Curvas de dicroismo circular.

La elipticidad molar a 282 nm que presenta el DNA libre en disolución es aproximadamente el doble de la que posee cuando forma parte de la cromatina; el DNA en la fibra cromosomal tiene una estructura terciaria que es la responsable de la reducción de su elipticidad molar; ésta estructura terciaria, se mantiene gracias a su interacción con las proteínas cromosomales, principalmente con las histonas. La ruptura triptica de enlaces peptídicos en las histonas provoca una desestructuración del DNA que se manifiesta en un aumento de su elipticidad molar hasta alcanzar, una vez finalizada la rotura de todos los enlaces, el valor propio del DNA libre. Si el proceso de desestructuración del DNA responde a una cinética de primer orden, la curva obtenida tendría por ecuación:

$$\theta_t = \theta_1 (1 - e^{-k_1 t})$$

donde θ_t es la elipticidad molar a 282 nm presentada por la cromatina a tiempo t después de la adición del enzima, θ_1 la elipticidad molar a 282 nm alcanzada una vez hidrolizados todos los enlaces y k_1 la constante de desestructuración del DNA producida a consecuencia de la hidrólisis.

La desestructuración del DNA puede responder también a la suma de varios procesos distintos. En éste caso, puede ocurrir que dichos procesos se produzcan a la vez y comiencen al mismo tiempo, desarrollándose cada uno de ellos con una constante distinta; entonces, la ecuación de la curva obtenida será:

$$\theta_t = \sum_{i=1}^{i=n} \theta_i (1 - e^{-k_i t})$$

donde Θ_t es la $[\Theta]_{282}$ presentada por la cromatina a tiempo t después de la adición de enzima, Θ_i la $[\Theta]_{282}$ alcanzada como consecuencia de la finalización del proceso i y k_i la constante característica de dicho proceso.

La obtención de parámetros a partir de la curva experimental puede realizarse igualmente que en el apartado 2.11.5.1., mediante la utilización del análisis gráfico o el empleo de un programa de cálculo adecuado.

2.11.5.2.1. Método de análisis gráfico.

Se realizó del modo ya descrito en el apartado 2.11.4.1.1. La mayoría de las curvas obtenidas respondió a la ecuación:

$$\Theta_t = \Theta_1(1 - e^{-k_1 t}) + \Theta_2(1 - e^{-k_2 t})$$

teniendo en cuenta que k_1 y k_2 difieren, en la mayoría de los casos, en un factor del orden de magnitud de 10, puede considerarse que en los tiempos finales de incubación sólo se está produciendo desestructuración del DNA a causa del proceso regido por la constante k_2 y por tanto:

$$\Theta_t = \Theta_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad (II)$$

representando: $\ln(\Theta_t - \Theta_2)$ frente a t obtenemos una línea recta a partir de la cual podemos deducir los valores de Θ_2 y k_2 .

Restando de cada punto correspondiente del tramo curvo de la representación anterior, a tiempos cortos de incubación en que tiene lugar el proceso regido por k_1 y, por tanto no es válida la expresión (II), los valores correspondientes de la recta trazada

utilizando los tiempos finales, obtendremos otra línea recta que nos dará los parámetros correspondientes al proceso rápido.

2.11.5.2.2. Análisis mediante programa de cálculo

El programa utilizado y los criterios empleados en la elección del mejor ajuste de cada gráfica fueron los mismos que los indicados en el apartado 2.11.5.2:1.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Propiedades de la cromatina soluble

La cromatina soluble obtenida a partir de los núcleos de eritrocito de pollo como se indica en el apartado 2.2. se sometió a un conjunto de pruebas físicas y bioquímicas con el objeto de obtener información acerca de su estado estructural como etapa previa a estudios posteriores.

3.1.1. Espectro de absorción

El espectro ultravioleta en la zona de 330-230 nm de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM, pH=8.0 se presenta en la figura 13. Como puede observarse el máximo de absorción está centrado en 257 nm y el mínimo en 235 nm; la relación A_{230}/A_{260} es aproximadamente igual a 0,70. En la zona 330-310 nm no hay absorción apreciable, de modo que la relación A_{230}/A_{260} es menor a 0.05. Todas estas características son las propias de cromatina soluble no contaminada por materiales extracromosomales (Rill y Van Holde, 1973).

3.1.2. Espectro de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular de cromatina en la zona del ultravioleta próximo (260-230 nm) posee un máximo a 283 nm y un hombro centrado en 273 nm; es también característica la presencia de un pequeño mínimo en la zona de 295-310 nm.

La cromatina de eritrocito de pollo posee una elipticidad molar máxima de aproximadamente $4300^{\circ}\text{cm}^2/\text{d mol}$ y una relación $\theta_{273}/\theta_{283}$ de 0,97 (Hjelm y Huang, 1975).

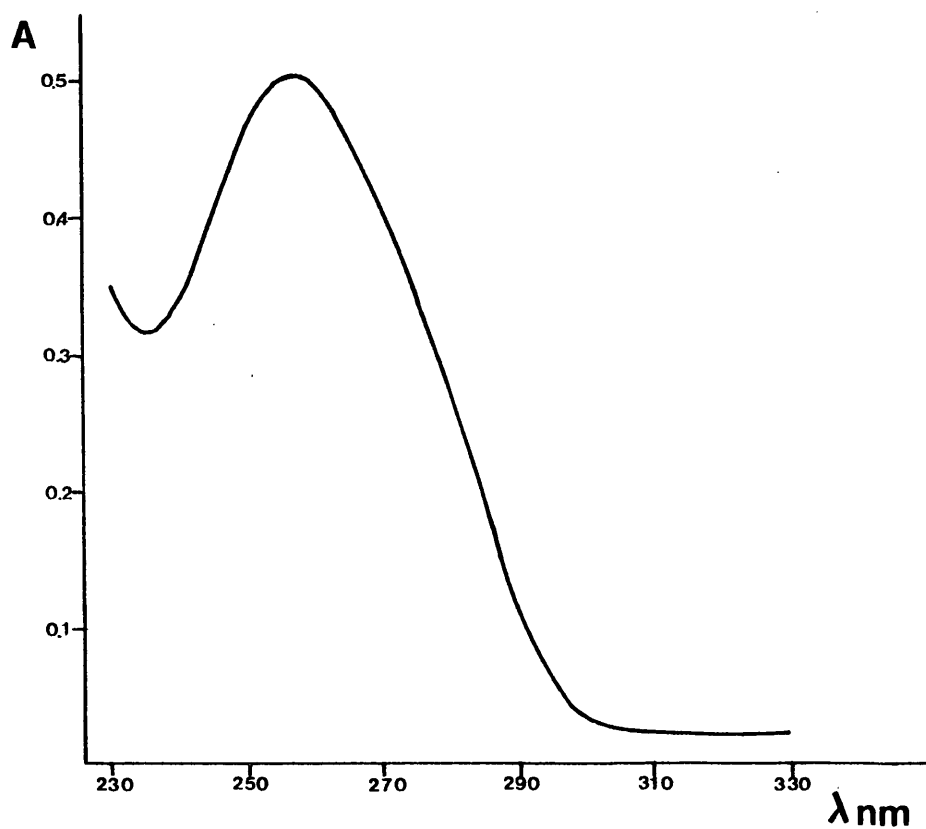


Fig. 13.- Espectro de absorción de cromatina soluble en tampón Tris-ClH 5 mM y EDTA 1 mM a pH=8.0, obtenida según se indica en el apartado 2.2.

El espectro de dicroísmo circular de la cromatina obtenida en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM, pH=8.0 (figura 14) presenta todas las características anteriormente mencionadas.

3.1.3. Electroforésis de histonas

En la figura 15b se muestra la imagen electroforética de las proteínas presentes en la cromatina soluble. Puede observarse la presencia de 7 bandas principales; tres de ellas, las de menor movilidad electroforética, corresponden a las histonas ricas en lisina: subfracciones a y b de la histona H1 e histona H5 específica de eritrocito de ave. Las cuatro restantes, de mayor movilidad electroforética son las histonas internas: H3, H2B, H2A y H4. No están presentes ninguna de las bandas características debidas a proteólisis de histonas, lo cual, juntamente con el resultado de otras pruebas que se mostrarán más adelante, es índice de la integridad estructural del material obtenido.

Asimismo, no son apenas visibles las bandas correspondientes a proteínas cromosomales no histona, ya que éstas se encuentran en muy baja proporción en este material biológico (Dingman y Sporn, 1964). No obstante, si es posible poner de manifiesto la presencia de éstas proteínas mediante la aplicación en el gel de mayores cantidades de muestra (Fig. 15 a).

3.1.4. Estudio del tamaño de los fragmentos de cromatina obtenidos en el proceso de solubilización

Como se ha indicado en el apartado 2.2. el procedimiento de solubilización utilizado fué el de fragmentación enzimática mediante una breve incubación con nucleasa micrococcal; en las condiciones utilizadas es de esperar que se obtenga una mezcla de

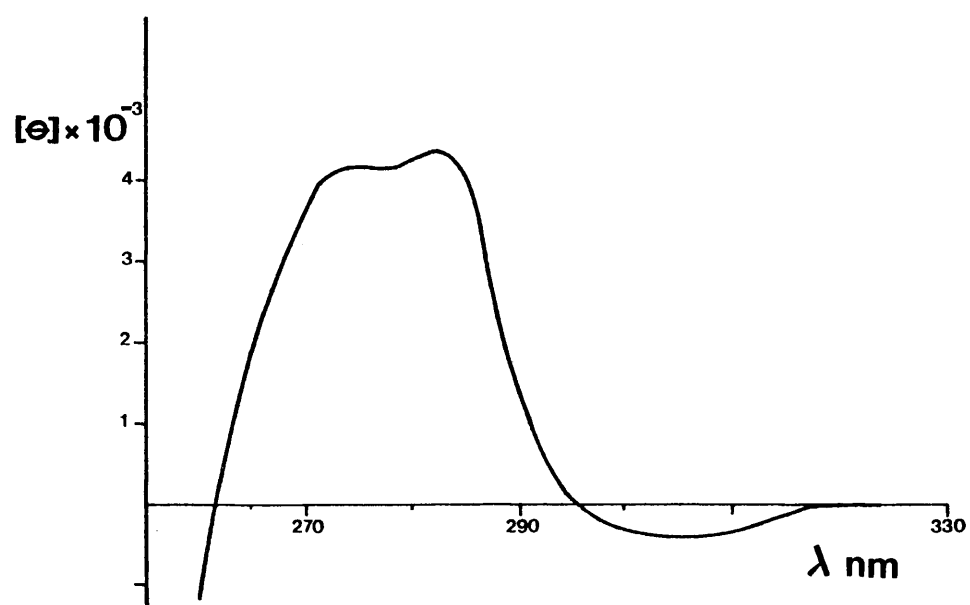


Fig. 14..- Espectro de dicroísmo circular en la zona del U.V. próximo de cromatina soluble en tampón Tris-ClH 5 mM y EDTA 1 mM a pH=8.0, obtenida como se indica en el apartado 2.2.

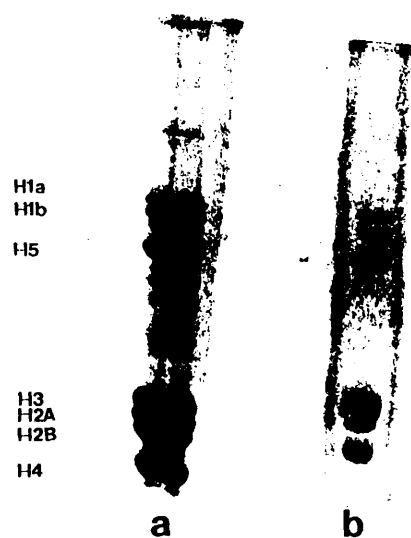


Fig. 15.- Electroforésis por el método descrito en el apartado 2.11.1.1. de las proteínas presentes en la cromatina soluble obtenida como se indica en el apartado 2.2.

a) Aplicación de 30 μ g de cromatina

b) Aplicación de 10 μ g de cromatina

oligonucleosomas con predominio de fragmentos superiores a seis nucleosomas, cadenas de alto Pm y baja proporción de monómeros, dímeros etc...

3.1.4.1. Electroforésis en geles de agarosa.

La electroforésis en geles de agarosa 0,7% permite resolver mezclas de fragmentos de DNA de alto peso molecular. En la figura 16 se muestra un esquema de la imagen electroforética obtenida a partir de una muestra de cromatina soluble. Puede observarse la presencia de una mancha difusa de alta movilidad electroforética (B) que corresponde a los mono y oligonucleosomas que no se resuelven en este tipo de electroforésis y una banda estrecha (A), de mayor intensidad, que, por su escasa migración electroforética corresponde a oligómeros de gran tamaño molecular.

3.1.4.2. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

La ultracentrifugación en gradientes de sacarosa del 5 al 20% es otra técnica utilizable para la resolución de mezclas heterogéneas de fragmentos de DNA. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de ésta técnica, según se describe en el apartado 2.11.2. confirman los ya mencionados en el apartado anterior.

En la figura 17a se muestra la lectura a 254 nm de un gradiente en el que se había aplicado cromatina soluble en tampón Tris-ClH 10mM y EDTA 10mM a pH=8.0. Puede observarse la presencia de dos picos (A y B) en la zona cercana al principio del gradiente; el primero de ellos, que apenas ha penetrado, se encuentra a la misma altura que el obtenido mediante la ultracentrifugación, en las mismas condiciones, de una preparación homogénea de nucleosomas (figura 17 b); el segundo corresponde a dinucleosomas; a

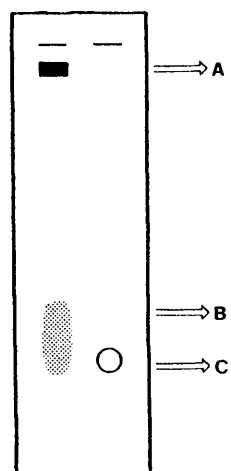


Fig. 16.- Electroforésis en geles de agarosa 0,7% (apartado 2.11. 1.3.) de cromatina soluble obtenida por el método descrito en el apartado 2.2.

A - oligonucleosomas de alto peso molecular

B - oligonucleosomas de cadena corta

C - mononucleosomas

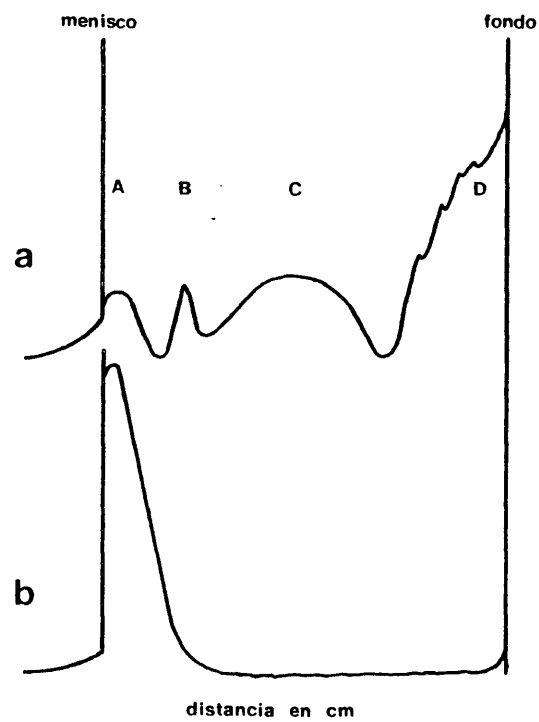


Fig. 17.- a) Ultracentrifugación de cromatina soluble en gradiente de sacarosa del 5-20% en las condiciones indicadas en el apartado 2.11.2.

A - mononucleosomas

B - dinucleosomas

C - oligonucleosomas de cadena corta

D - oligonucleosomas de alto peso molecular

b) Ultracentrifugación de mononucleosomas en gradiente de sacarosa en las mismas condiciones que a).

continuación, en la zona media del gradiente, se aprecia la presencia de oligómeros de tamaño medio (C) y finalmente, en la zona próxima al fondo del gradiente es visible un amplio pico (D) correspondiente a oligómeros de alto peso molecular. Puede concluirse provisionalmente, que la cromatina soluble obtenida se encuentra mayoritariamente formada por oligonucleosomas de alto peso molecular y una amplia mezcla de oligonucleosomas de tamaño medio con baja proporción de mono y dinucleosomas.

3.1.5. Incubación con nucleasa de micrococos

El tratamiento con nucleasa de micrococos es una prueba bioquímica frecuentemente utilizada para confirmar que durante todo el proceso de aislamiento de la misma no se ha perdido su organización subunitaria en partículas discretas ó nucleosomas. En la figura 18a se muestra la imagen electroforética obtenida en condiciones^{no} desnaturalizantes del DNA de la cromatina soluble digerida con nucleasa de micrococos durante 10 minutos a 37°C empleando 40 unidades de enzima por miligramo de DNA como se indica en el apartado 2.5. Puede apreciarse la presencia de dos bandas muy tenues que, por su tamaño molecular, aproximadamente 636 y 352 pares de bases, corresponden al trinucleosoma y dinucleosoma respectivamente; en la zona mas cercana al final del gel son visibles otras dos bandas cercanas más intensas de aproximadamente 214 y 195 pares de bases. La primera de ellas se debe al DNA protegido por las histonas internas mas una molécula de la histona H5; la segunda, de 195 pares de bases, corresponde al DNA protegido por las histonas internas más una molécula de H1. Esto concuerda con la microheterogeneidad encontrada en los mononucleosomos

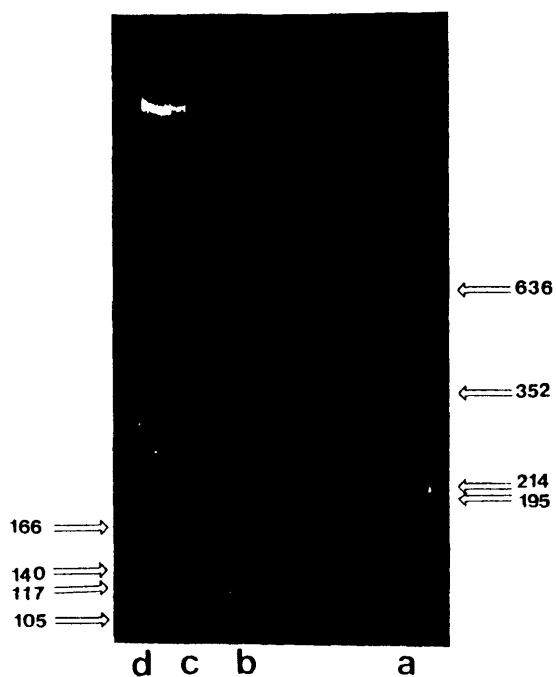


Fig. 18.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 3,5%-agarosa 0,5%
(apartado 2.11.1.2.)

- a) cromatina soluble incubada 10 min con nucleasa de micrococo (40 unidades/mg DNA) a 37°C
- b) cromatina digerida con tripsina e incubada 5 min con nucleasa de micrococo a 37°C (50 unidades/mg DNA)
- c) cromatina digerida con tripsina e incubada 1 min con nucleasa de micrococo en las mismas condiciones que b.
- d) cromatina digerida con tripsina sin incubar con nucleasa de micrococo.

mas de eritrocito de pollo que, según posean la histona H1 o la H5 protegen una longitud de DNA menor o mayor (Vakayeva y Bakayev, 1978).

El hecho de que la ulterior incubación de la cromatina soluble con nucleasa de micrococos dé lugar, mayoritariamente, a mononucleosomas y se encuentren ausentes las bandas de DNA de alto peso molecular, corrobora la hipótesis enunciada en los apartados 3.1.4.1. y 3.1.4.2. de que la banda A visible en la electroforesis de cromatina soluble en geles de agarosa 0,7% y el pico D obtenido por ultracentrifugación de la cromatina soluble en gradientes de sacarosa del 5 al 20% corresponden a oligonucleosomas de alto peso molecular; éstos se han convertido, mediante el posterior tratamiento enzimático, en su mayoría, en sus unidades monoméricas. Todo ello indica además la correcta organización estructural de la cromatina soluble obtenida.

3.1.6. Incubación con desoxirribonucleasa I

Cuando se incuban núcleos o cromatina con DNasa I se obtiene un conjunto de fragmentos de DNA que si se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes resultan ser múltiplos de 10 bases. Esta periodicidad de tamaños es reflejo de la organización del DNA dentro de cada subunidad o nucleosoma, y su obtención se emplea como criterio de integridad estructural.

La figura 19 es la imagen electroforética de un digerido de cromatina soluble con DNasa I obtenido en las condiciones descritas en el apartado 2.6. y analizado en condiciones desnaturizan

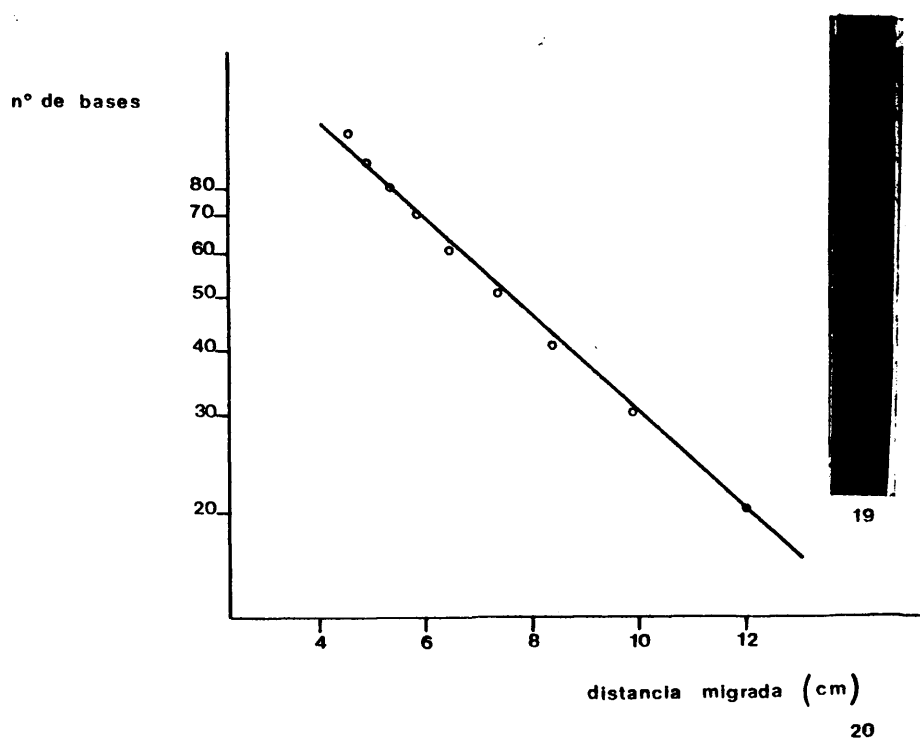


Fig. 19.- Imagen electroforética obtenida en condiciones desnaturalizantes (apartado 2.11.1.4.) de cromatina soluble digerida con DNasa I (80 unidades Kunitz por mg de DNA) a 37°C durante 2 min.

Fig. 20.- Representación semilogarítmica del número de bases de DNA frente a-su movilidad electroforética.

tes. La presencia de bandas discretas es indicio de que la estructura interna del nucleosoma se mantiene.

Si se supone que la banda de mayor movilidad electroforética es la de 20 bases, el resto de las bandas, de mayor a menor movilidad electroforética serían las de 30, 40, 50... hasta 100 bases. Esto se comprueba mediante la representación de la movilidad de cada banda en centímetros frente al logaritmo de su número de bases (figura 20). Mediante dicha representación se obtiene una línea recta ya que en las condiciones electroforéticas utilizadas (apartado 2.11.1.4.) la movilidad de cada banda es función lineal con el logaritmo de su peso molecular.

3.1.7. Extracción selectiva de las histonas H1 y H5 de la cromatina soluble

Con objeto de estudiar el papel de éstas histonas en la organización de la fibra cromosomal, se emplearon distintos métodos para su eliminación selectiva.

3.1.7.1. Disociación salina.

El procedimiento seguido se detalla en el apartado 2.3.1. El material disociado se fraccionó por cromatografía en columna de C-L Sepharose 6B. En la figura 21 se presente el perfil de elución obtenido en dicha cromatografía mediante la valoración de las fracciones por medida de su absorbancia a 230 y 260 nm.

El material presente en el pico I posee un peso molecular elevado ya que resulta excluido y representa la cromatina residual puesto que posee una mayor absorbancia a 260 nm, longitud de

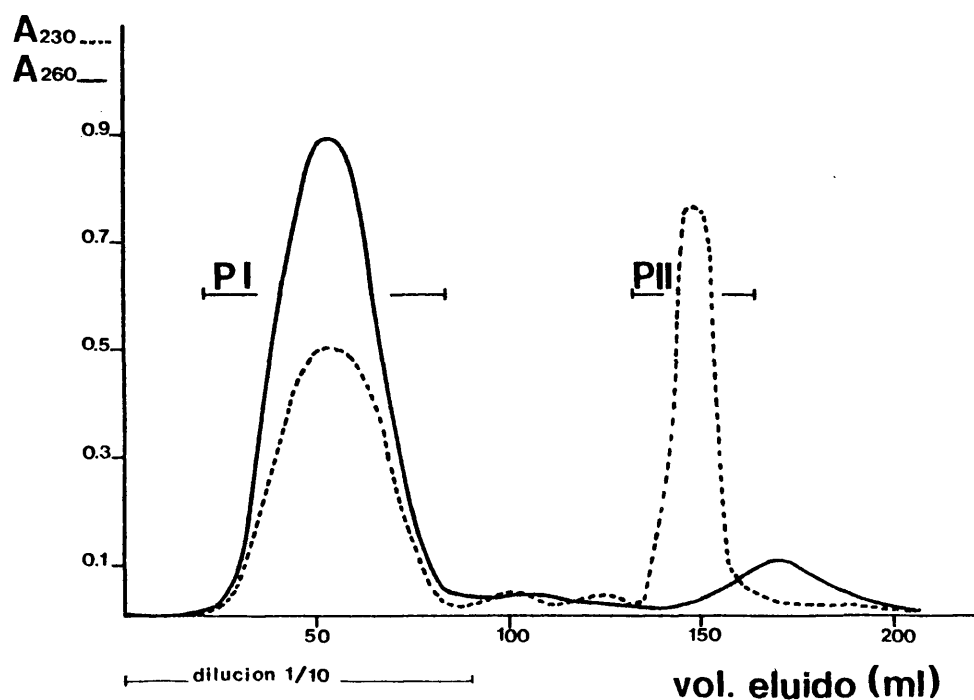


Fig. 21.- Perfil cromatográfico en CL-Sepharose 6B del material disociado con ClNa 0.65 M como se indica en el apartado 2.3.1. Se midieron las absorbancias a 260 (—) y 230 (---)nm. En el perfil se señalan las dos fracciones que se recogieron y que corresponden:

PI cromatina residual
 PII proteínas disociadas

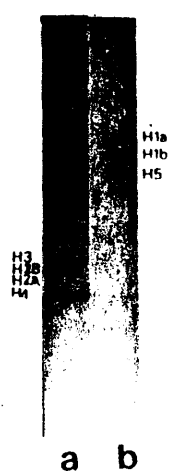


Fig. 22.- Electroforésis realizada por el método descrito en el apartado 2.11.1.1.
a) proteínas presentes en la cromatina después del tratamiento con ClNa 0.65 M.
b) proteínas disociadas.

onda a la que absorben los ácidos nucleicos, que a 230 nm. La imagen electroforética de las proteínas presentes en la cromatina residual se muestra en la figura 22a; como puede observarse se encuentran presentes las histonas internas H3, H2B, H2A y H4 y también una pequeña parte de la subfracción a de la histona H1.

El pico II contiene el material disociado de naturaleza proteica como lo indica su gran absorción a 230 nm y su escasa absorción a 260 nm. Su imagen electroforética (figura 22b) indica que en él se encuentra la histona H5, la subfracción b de la Histona H1 y parte de la subfracción a de ésta histona.

El espectro de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo de la cromatina disociada (figura 23) posee las mismas características que el de la cromatina de partida aunque la elipticidad molar a 283 nm resulta incrementada en $700^{\circ}\text{cm}^2/\text{d mol}$. Este valor es ligeramente inferior al encontrado por Cowman y Fasman (1978) de $1100^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ (Θ_{280} cromatina nativa; $4100^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ y Θ_{280} cromatina carente de histonas H1/H5: $5200^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$). Posiblemente la pequeña parte de la fracción a de la histona H1 que permanece después de la disociación sea la responsable de esta diferencia.

3.1.7.2. Método del ácido cítrico.

De las dos variantes de este método indicadas en el apartado 2.3.3., la de Ring y Cole (1979) fué la que dió mejores resultados; ésta implica dos extracciones con tampón ac.cítrico-fosfato 50mM, sacarosa 0,25M, ClK 25mM, Cl_2Mg 1mM y Cl_2Ca 1mM a pH=2.1.

La imagen electroforética de las histonas eliminadas en los sobrenadantes de ambas extracciones, así como de las histonas pre

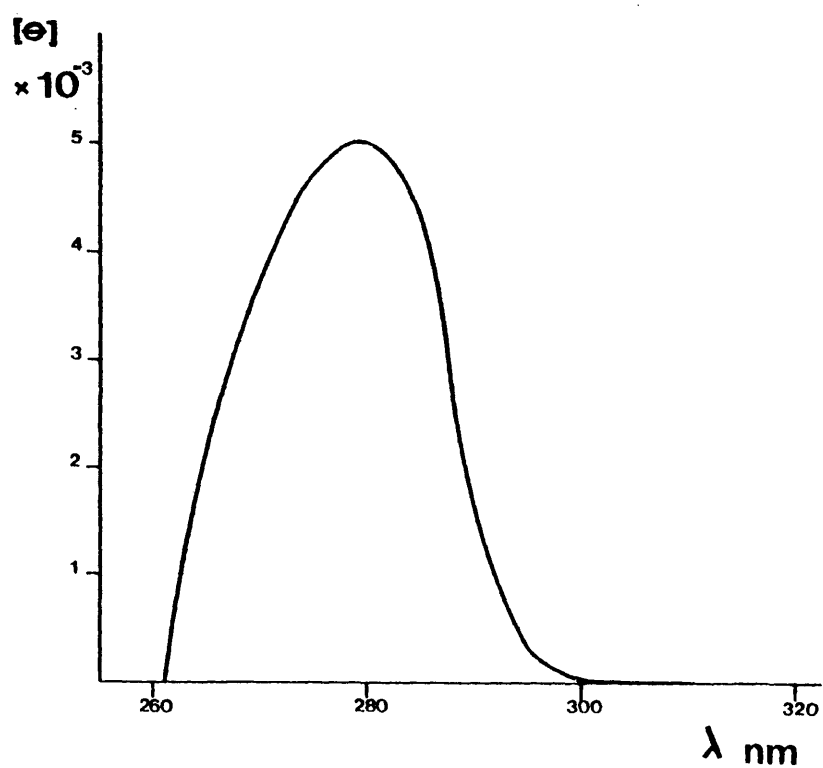


Fig. 23.- Espectro de dicroísmo circular en la zona del U.V. próximo de la cromatina residual obtenida después de la disociación con ClNa 0.65 M.

ses en la cromatina residual obtenida después del tratamiento se muestran en la figura 24; con la primera extracción se elimina principalmente la subfracción b de la histona H1 y parte de la subfracción a de ésta histona. La segunda extracción elimina una cantidad adicional de la subfracción a de la histona H1. En la cromatina residual están presentes las histonas internas, la histona H5 y parte de la subfracción a de la histona H1 que no se elimina con ambas extracciones.

3.1.7.3. Tratamiento con resina de intercambio catiónico

El tratamiento con la resina Dowex 50W x 8 condujo, en las condiciones utilizadas, a la extracción parcial de las histonas internas, por lo que no se consideró conveniente su aplicación con fines a la utilización de la cromatina residual.

De los tres métodos citados, el más eficaz para la extracción de las histonas ricas en lisina fué la disociación salina, ya que aunque no elimina completamente la subfracción a de la histona H1, sólo queda de ella una cantidad muy pequeña, siendo total la eliminación de la subfracción b y de la histona H5. El tratamiento con ácido cítrico no elimina la histona H5 y deja también una pequeña parte de la subfracción a de la histona H1, y el tratamiento con resina debe descartarse por extraer parcialmente las histonas internas.

3.1.8. Influencia de la fuerza iónica en la estructura de la cromatina

El objeto de éste estudio fue el de escoger los valores más adecuados de concentración salina para realizar posteriormente los experimentos de hidrólisis triptica de la fibra cromosomal en diferentes estados conformacionales.



Fig. 24.- Electroforésis realizada por el método descrito en el apartado 2.11.1.1.

- a) proteínas presentes en la cromatina después de extraer dos veces los núcleos con Tampón ac. cítrico-fosfato 50 mM, sacarosa 0,25 M, ClK 25 mM, Cl_2Mg 1mM y Cl_2Ca 1 mM a pH = 2.1
- b) proteínas obtenidas en el sobrenadante de la primera extracción.
- c) proteínas obtenidas en el sobrenadante de la segunda extracción.

La presencia de distintas concentraciones salinas en el medio de disolución de la cromatina influye en el estado conformacional de ésta. Las variaciones conformacionales inducidas por la fuerza iónica del medio se estudiaron en un intervalo de concentración de ClNa de 0 a 0,6 M, ya que por encima de éste último valor de concentración salina empieza a producirse la disociación de las histonas (Wilhelm y Champagne, 1969).

Primeramente se determinó la variación en la solubilidad de la cromatina en disoluciones de distinta fuerza iónica mediante la valoración de la turbidez a 350 nm. Para ello se tomaron volúmenes iguales de una disolución de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 a una concentración de DNA de 0,24 mg/ml y se añadió a cada uno de ellos un volumen igual de distintas disoluciones de ClNa (0,1M, 0,2M, 0,4M, 0,6M, 0,8M, 1.0M y 1.2M), todas ellas en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0, con objeto de conseguir la fuerza iónica deseada. Como puede apreciarse en la figura 25 existe un mínimo de solubilidad (máximo de turbidez) centrado en ClNa 0,25M. Este mínimo de solubilidad lo presenta también la cromatina obtenida a partir de otros materiales biológicos como timo de ternera (Bradbury y col., 1973) y levadura (López-Braña, tesis doctoral).

Debido a las complicaciones que traería consigo hidrolizar con tripsina cromatina parcialmente insoluble, se desechó la idea de emplear disoluciones de concentración salina mayores de 0,1M. A ésta fuerza iónica es también apreciable una ligera turbidez, no obstante, dado que la precipitación de una macromolécula guarda relación con su concentración en disolución, se pueden utilizar disoluciones de cromatina menos concentradas y evitar de este modo su insolubilidad. A una concentración de DNA de 70 µg/ml no

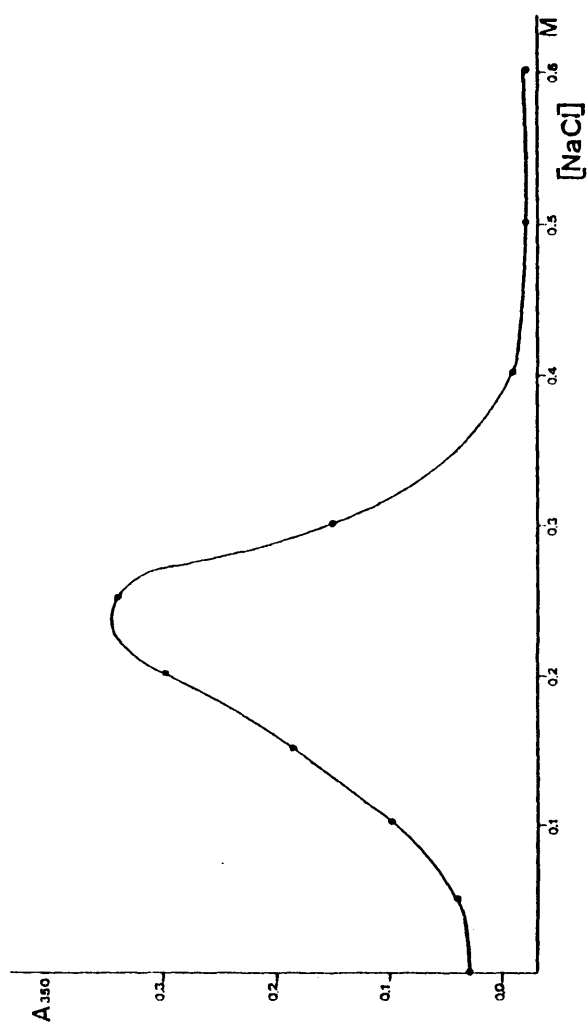


Fig. 25.- Solubilidad de la cromatina frente a la fuerza iónica representada por la concentración de $ClNa$.

se apreciaba turbidez a 350 nm, lo cual es indicio de que no se produce precipitación.

Posteriormente se estudiaron las variaciones conformacionales inducidas por la fuerza iónica en el intervalo de concentración de ClNa de 0 a 100 mM. Estos se realizaron en cromatina nativa y liberada de histonas ricas en lisina (mediante el procedimiento de disociación salina). Se registró el espectro de D.C. en la zona del U.V. próximo de cromatina disuelta a una concentración de DNA de 70 µg/ml en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 y ClNa en la concentración que se indica en abscisas en la figura 26. Puede apreciarse un máximo en la elipticidad molar a 280 nm en ClNa 10mM. Este máximo está ausente en cromatina liberada de histonas ricas en lisina. Finalmente, desde un valor de concentración de ClNa de 20mM hasta 100mM se produce un descenso gradual de la elipticidad molar a 280 nm en ambos casos. La interpretación de éstos resultados se discutirá más adelante a la luz de otros resultados.

3.2. Experimentos de hidrólisis trípica

3.2.1. Optimización de las condiciones metodológicas

En este apartado se indican los resultados de los ensayos realizados para determinar las condiciones óptimas de detención de la acción del enzima mediante la utilización de distintos inhibidores; también se exponen los resultados del estudio realizado sobre la modificación inducida en la actividad enzimática por distintas temperaturas y condiciones del medio, todo ello necesario

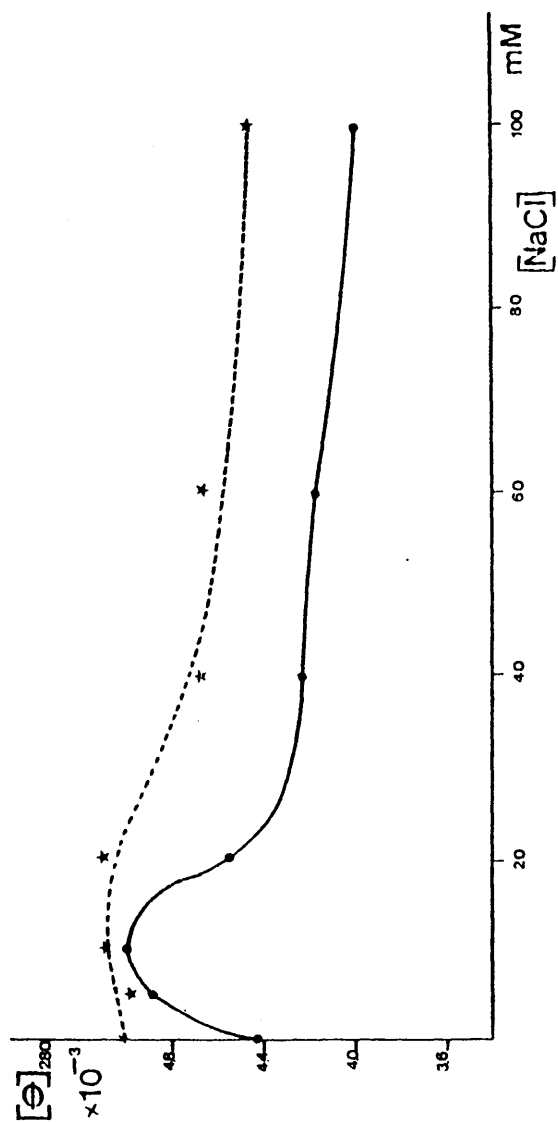


Fig. 26.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm de la cromatina nativa (—) y cromatina desprovista de histonas ricas en lisina (---) con la fuerza iónica representada por la concentración de ClNa .

para la unificación de los resultados de experimentos posteriores de incubación triptica de cromatina en distintas condiciones.

3.2.1.1. Inhibición de la acción triptica.

La determinación de las condiciones adecuadas para detener las hidrólisis tripticas realizadas a tiempos discretos se realizó después de ensayar tres productos diferentes: PMSF, TLCK e inhibidor de tripsina (de soja tipo 1-S).

Primeramente se probó el efecto del PMSF ya que éste es inhibidor de serin-proteasas y la tripsina se encuentra dentro de este grupo de enzimas. Se introdujeron 2,5 ml de una disolución de sustrato artificial BAPNA (1 mg/ml) en agua dentro de una cubeta de espectrofotómetro de un centímetro de paso óptico. Se añadieron 0,3 ml de tampón fosfato 0,3M a pH=8.0 y 0.2 ml de una disolución de tripsina en ClH 1mM (12,5 µg/ml) y se registró el incremento de absorbancia a 405 nm con el tiempo durante 5 minutos. A continuación se añadieron 100 µl de una disolución de PMSF en isopropanol (0,75 mg/ml) y se continuó registrando la absorbancia a 405 nm con el tiempo.

No se observó variación en la pendiente de la recta obtenida antes y después de la adición de PMSF, lo que indica que la velocidad de hidrólisis del enlace éster del sustrato por el enzima es la misma en presencia y ausencia de dicho producto, descartándose éste como inhibidor.

Se utilizó también, operando en las mismas condiciones, TLCK disuelto en agua en una proporción tres veces superior en peso respecto al enzima. En este caso, se observó en el momento de su

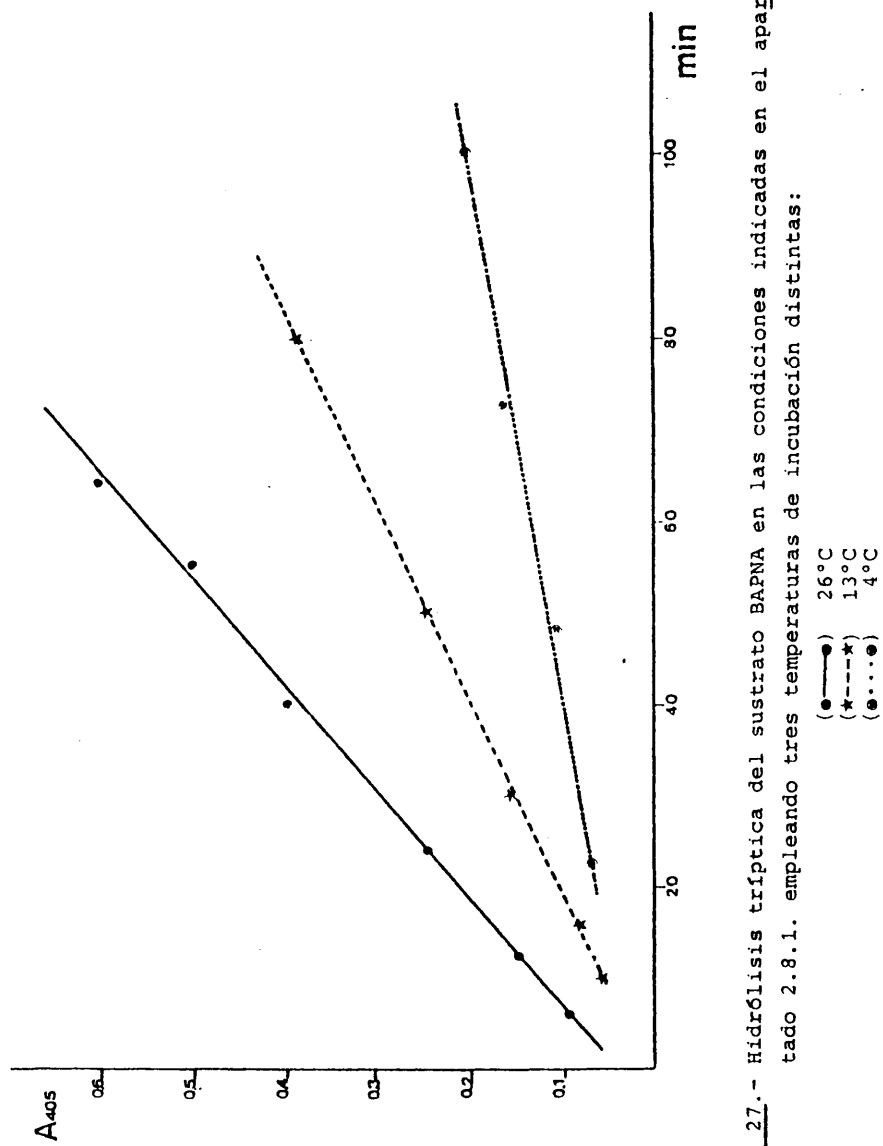


Fig. 27.- Hidrólisis triptica del sustrato BAPNA en las condiciones indicadas en el apartado 2.8.1. empleando tres temperaturas de incubación distintas:

(●—●) 26°C
 (*—*) 13°C
 (●...●) 4°C

adición la detención del incremento de la absorbancia a 405 nm, no registrándose variaciones durante un periodo de 4 horas. En periodos de tiempo más prolongados sí se pudo apreciar una continuación de la reacción enzimática como se deduce de los datos de la tabla II.

El mismo ensayo se repitió finalmente utilizando inhibidor de tripsina (de soja, tipo 1-S) (Sigma) en proporción dos veces en peso con relación a la tripsina. En este caso sí se observó el bloqueo de la reacción tanto a tiempos cortos como largos, eligiéndose éste como inhibidor más efectivo. No obstante, al hidrolizar cromatina con tripsina a distintos tiempos e incubar cada hidrolizado 30 min a 70°C con el disolvente de muestras de la electroforésis de Laemmli, pudo observarse después de realizar la electroforésis que todas las muestras estaban totalmente hidrolizadas aún cuando se había añadido inhibidor. El problema planteado por la incubación requerida en este tipo de electroforésis se resolvió satisfactoriamente substituyendo aquella por un tratamiento a 100°C durante 10 min.

3.2.1.2. Influencia de la temperatura en la actividad de la tripsina.

En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos al hidrolizar con tripsina el sustrato BAPNA a tres temperaturas diferentes 4, 13 y 26°C, en las condiciones especificadas en el apartado 2.8.1.

En los momentos iniciales de incubación el progreso de la reacción es lineal con el tiempo, de modo que la pendiente de la recta obtenida al representar la absorbancia a 405 nm frente al

TABLA II

t Tiempo transcurrido des de la adición del inhi- bidor (horas)	A ₄₀₅ a tiempo t - A ₄₀₅ a tiempo cero	
	4°C	Temperatura ambiente
0	0.00	0.00
4	0.00	0.00
24	0.21	0.21
72	0.57	1.50

tiempo nos indica la velocidad inicial de reacción y, como la concentración de sustrato y enzima empleado en los tres casos es la misma, la relación entre dichas velocidades iniciales es proporcional a la relación de constantes de reacción a cada temperatura.

Como puede apreciarse en la figura 27 la constante de hidrólisis a 13°C es casi tres veces mayor que la correspondiente a 4°C y dos veces inferior que la obtenida a 26°C, de modo que la actividad del enzima guarda función lineal con la temperatura de incubación.

3.2.1.3. Influencia de la fuerza iónica en la actividad de la tripsina

Antes de estudiar las cinéticas de digestión triptica de cromatina a distintas fuerzas iónicas, se consideró conveniente investigar la influencia de la fuerza iónica en la actividad del enzima. Para ello se hallaron las velocidades iniciales de hidrólisis del sustrato BAPNA por la tripsina a las fuerzas iónicas indicadas en la tabla III; en la misma se muestran los cocientes resultantes de dividir el valor obtenido de velocidad inicial a cada fuerza iónica por el correspondiente a una concentración salina de 20mM; todos los cocientes oscilan entre 0,85 y 1,08 veces del valor de éste.

Esta oscilación puede considerarse dentro del margen de error experimental por lo que no se estima necesario realizar ninguna corrección en las constantes de hidrólisis triptica de cromatina por una posible activación o inactivación del enzima dentro del intervalo de fuerzas iónicas utilizado.

TABLA III

I con ClNa (mM)	$\frac{v_{0I}}{v_{020}}$ (*)
0	0.85
5	0.91
10	1.04
20	1.00
40	1.08
60	1.00
100	0.85

(*) v_{0I} ——— velocidad inicial a la fuerza iónica I

v_{020} ——— velocidad inicial a la fuerza iónica correspondiente
te a ClNa 20 mM.

3.2.2. Cinética de hidrólisis triptica de histonas en la cromatina

La hidrólisis de las histonas a lo largo del tiempo se estudió mediante electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de alícuotas tomadas a distintos tiempos en el transcurso de la incubación. Primeramente se realizaron digestiones en condiciones muy suaves, a 4°C, y empleando una relación enzima/DNA igual a 1/1000. En estas condiciones, el proceso es lo suficientemente lento como para poder apreciar las distintas etapas del proceso de proteólisis. Las histonas que se hidrolizan primero son las ricas en lisina: en 20 minutos de incubación la histona H5 se ha hidrolizado completamente y la H1 prácticamente también (figura 28). La degradación de la histona H1 da lugar a varias bandas situadas por encima de la correspondiente a la histona H5. Durante este periodo, las histonas internas permanecen intactas. A las 4 horas de incubación (figura 29) se aprecia la aparición de un péptido (P1) que tiene aproximadamente la misma movilidad electroforética que la histona H5 y puede ser fácilmente confundible con ésta, sin embargo este péptido debe originarse a partir de las bandas de degradación de la histona H1 antes mencionadas ya que es también visible cuando se incuba cromatina carente de histona H5 con tripsina en las mismas condiciones (figura 30).

A la vista de los razonamientos anteriores está claro que el péptido P1 procede de la histona H1. Puede verse en la figura 29 que este péptido desaparece con el transcurso de la hidrólisis, a la par que aparecen otros, designados como P2 y P3 en la figura. El péptido P3 tiene una movilidad similar a la de la histona H3, pero no puede confundirse con ella, toda vez que ésta histona se degrada rápidamente. De hecho a las 4 horas de hidrólisis

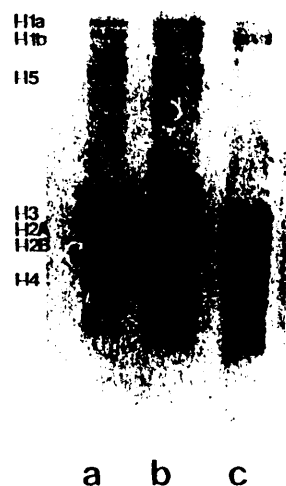


Fig. 28.- Electroforésis por el método descrito en el apartado

2.11.1.1.

a) cromatina intacta

b) y c) cromatina en Tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1 mM
a pH=8.0 digerida con tripsina a 4°C (relación
enzima/DNA= 1/1000) durante 0 (b) y 20 min (c).



Fig. 29..- Electroforésis por el método descrito en el apartado 2.11.1.1. Cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 incubada con tripsina a 4°C, durante los tiempos (de izda. a dcha.): 0,4 h , 8h , 20h , 25h , 30h , 44h , 50h , 56h , 70h , 78h y 100h . (Relación tripsina/DNA = 1:1000).

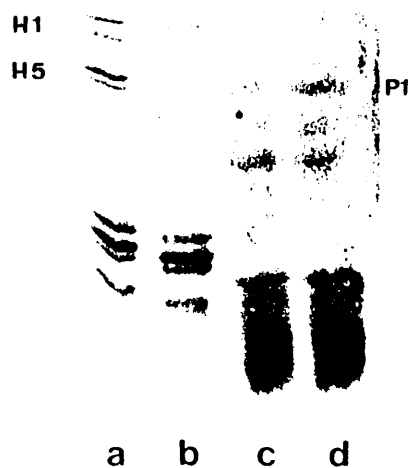


Fig. 30..- Electroforésis por el método descrito en el apartado 2.11.1.1.
a) cromatina intacta
b) cromatina carente de histona H5
c) y d) cromatina carente de histona H5 en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 digerida con tripsina durante 25 horas a 4°C. (relación enzima/DNA = 1/1000).

ya no se aprecian más las trazas de ella (figura 29). Así pues, los péptidos P2 y P3 deben proceder, teniendo en cuenta su movilidad, de las histonas H1 ó H5.

Para decidir su origen se procedió al densitometrado de la placa de la figura 29, que se recoge en la figura 31. A partir de los trazados densitométricos se integraron las bandas correspondientes a P1, P2 y P3, cuya variación con el tiempo se representa en la figura 32. A la vista de ésta figura parece lógico su poner que el péptido P3 se origina a partir del P2 y éste a partir del P1, por lo que todos, en principio, proceden en último término de la histona H1. Hay que advertir que las áreas de las bandas correspondientes a éstos péptidos son proporcionales a la concentración de los péptidos, pero puesto que el gel estaba teñido con azul Coomassie, la relación entre área y concentración no es necesariamente lineal. Esto impide obtener relaciones cuantitativas, pero, de cualquier modo, la forma de las curvas, y la sucesión temporal, con que cada una alcanza su máximo, permite llegar a la conclusión antes indicada sobre el origen de los péptidos.

De las histonas internas, la H3 es la más susceptible a la hidrólisis; como ya se ha mencionado, a las 4 horas de incubación sólo son visibles trazas de ella (figura 29). Como consecuencia de su hidrólisis se origina el péptido P4, que migra entre las histonas H2A y H4. Este péptido coincide en movilidad electroforética con el péptido P1 identificado por Weintraub y Van Lente (1974) como procedente de la histona H3.

La banda correspondiente a la histona H2B mantiene su intensidad constante hasta las 8 horas de digestión, a partir de éste

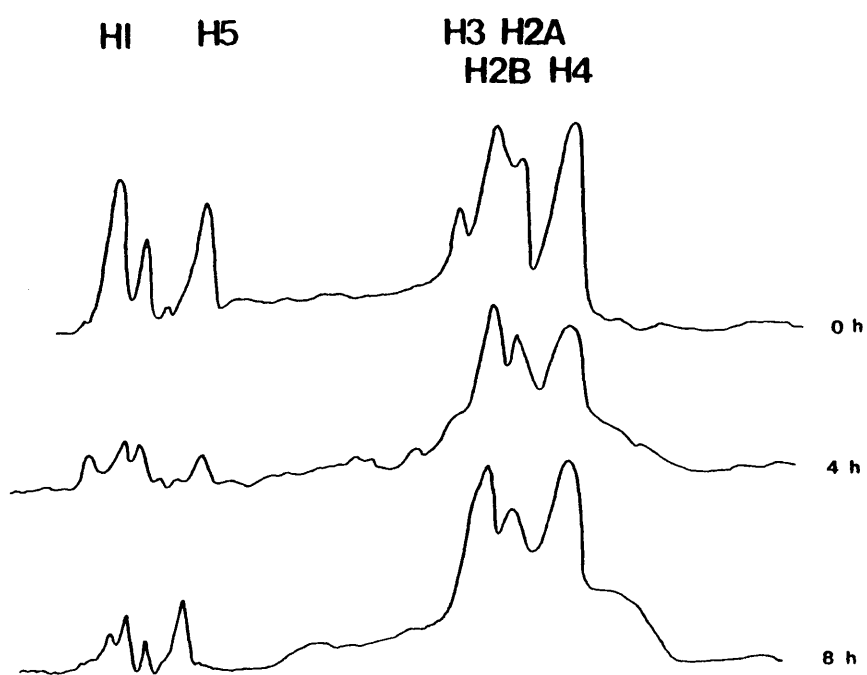
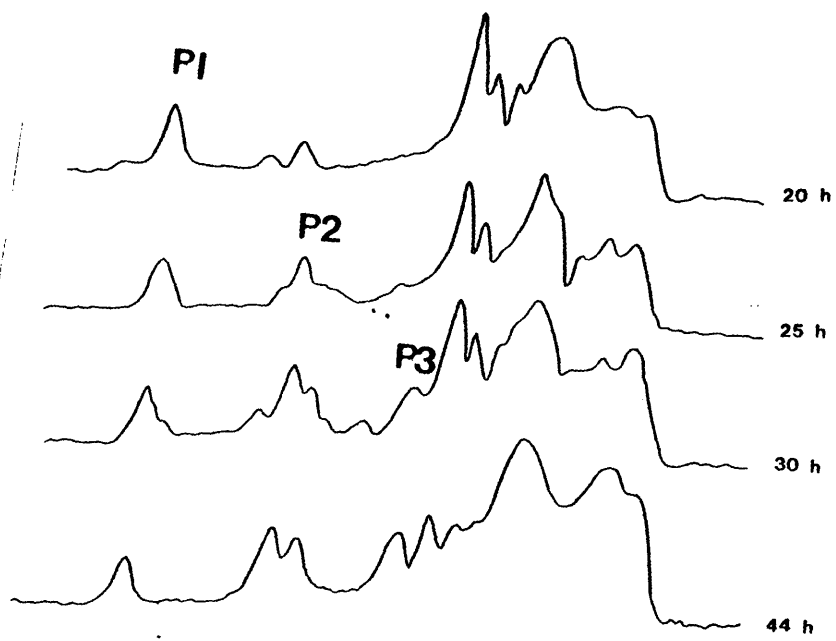
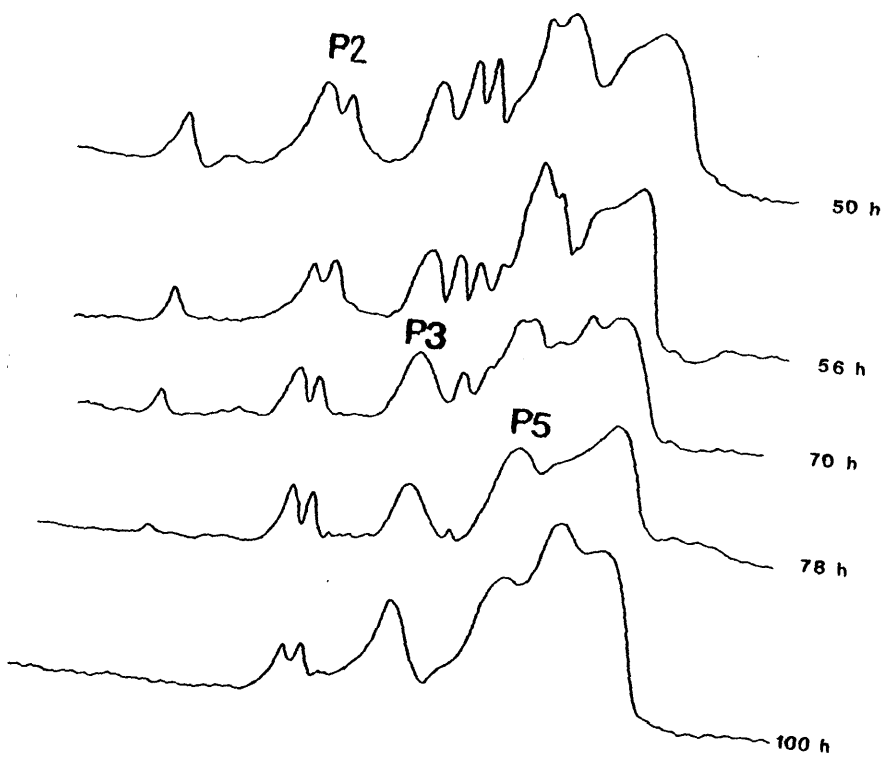


Fig. 31..- Densitograma de las imágenes electroforéticas de los digeridos trípticos mostrados en la figura 29.

109 ~



109.6



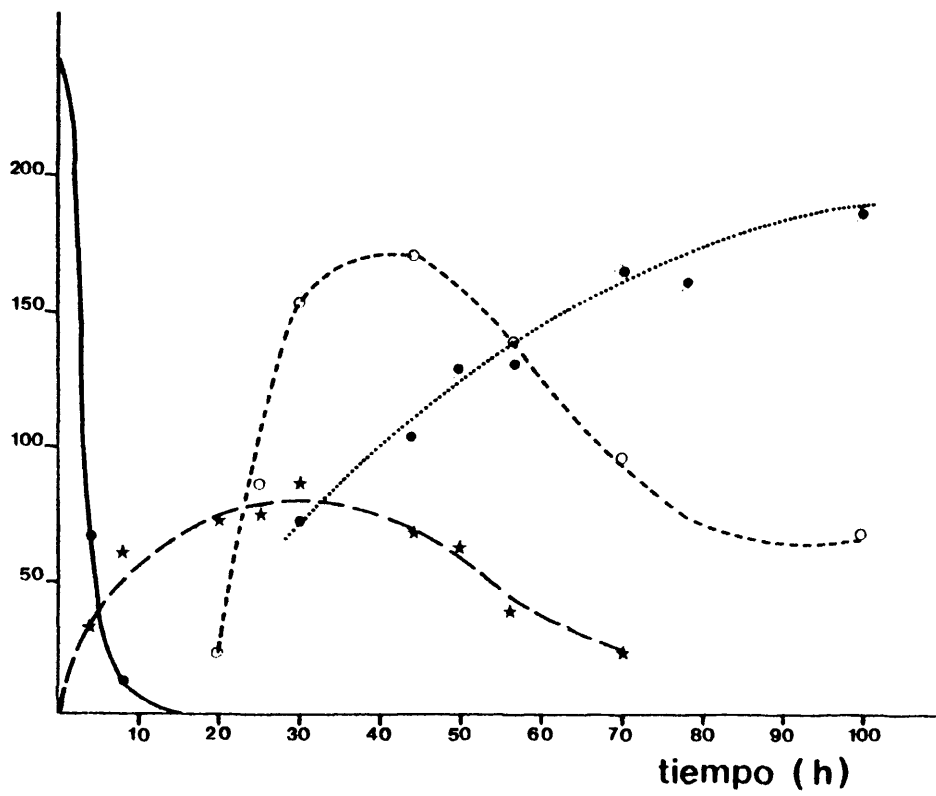


Fig. 32.- Variación con el tiempo de la intensidad de las bandas correspondientes a la histona H1 (—●—●—); P1 (★—★—); P2 (—○---○-- y P3 (●...●.).

tiempo va disminuyendo progresivamente y deja de ser visible a partir de las 50 horas de incubación (figuras 29 y 30).

En el caso de las histonas H2A y H4 es más difícil seguir el curso de su degradación. La banda correspondiente a la histona H2A resulta enmascarada en los dos primeros tiempos de digestión (4 y 8 horas) por la correspondiente al péptido P4. A partir de éste tiempo permanece en forma de banda muy tenue, siempre de menor intensidad que la correspondiente a la histona H2B, hasta las 30 horas de incubación (figuras 29 y 30). La histona H4 permanece intacta hasta las 8 horas; después es visible una banda (P5) cuya movilidad es ligeramente inferior a la de la H4 y que posiblemente proceda, por proteólisis, del péptido P4. El péptido P5 se mantiene hasta los tiempos finales de incubación. (figuras 29 y 30).

Atendiendo al estado de proteólisis de las histonas y a la presencia de determinados péptidos pueden distinguirse tres etapas en el proceso de digestión triptica de cromatina:

- 1ª etapa (0-8 horas): caracterizada por la degradación de las histonas H1 y H5, la aparición del péptido P1 procedente de la histona H1 y la degradación de la histona H3 con la aparición simultánea del péptido P4 originado a partir de ella.

- 2ª etapa (8-44/50 horas): durante éste periodo el pept

P1 se hidroliza progresivamente aparece el P2. Las histonas H2B también se van degradando así como



péptido P4 que dá lugar al P5.

- 3ª etapa (44/50-78 horas): caracterizado por la ausencia de histonas intactas y la presencia de los péptidos P2, P3, P5 y P6, que se van hidrolizando en el transcurso de ésta etapa.

La figura 33 ilustra el resultado de una cinética de hidrólisis triptica de cromatina realizada a 4°C empleando una relación enzima/DNA de 1/600. En éste caso, ya a las tres horas de incubación se encuentra una imagen electroforética correspondiente a lo que anteriormente se ha llamado segunda etapa, con la presencia de los péptidos P1, P2, P4, P5 y P6 y las histonas H2B y H2A. Hay también una banda a la altura de la histona H4; sin embargo no puede asegurarse que corresponda a ésta histona ya que está descrita la producción, por digestión triptica de núcleos de eritrocito de pollo, de un péptido procedente de la histona H2A de movilidad electroforética idéntica a la histona H4 (Böhm y col., 1980).

A las 22 horas en éstas condiciones parece haberse alcanzado casi el final de la tercera etapa ya que sólo son visibles los péptidos P3, P5 y P6 y la banda a la altura de la histona H4. Obsérvese que el péptido P5 se empieza a hidrolizar a las 22 horas y desaparece a las 46 horas; a partir de este tiempo sólo permanecen los péptidos P3 y P6.

En incubaciones realizadas a 13°C empleando una relación enzima/DNA de 1/300 no ha sido apreciable la primera etapa en el primer tiempo de digestión analizado (una hora). La segunda etapa dura hasta las 4-5 horas, y en la tercera etapa, a las 49 horas

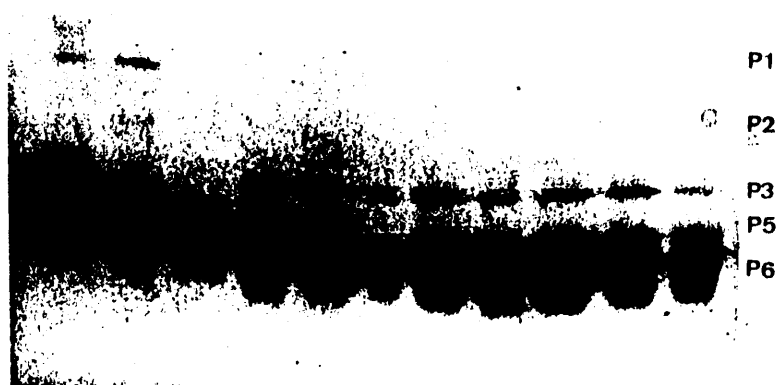


Fig. 33.- Electroforésis por el método descrito en el apartado
2.11.1.1. Cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM
digerida con tripsina a 4°C (relación enzima/DNA=1:600)
durante los siguientes tiempos (de izda. a dcha.): 0, 3h,
6h, 22h, 29h, 46h, 54h, 69h, 94h, 120h y 168h.

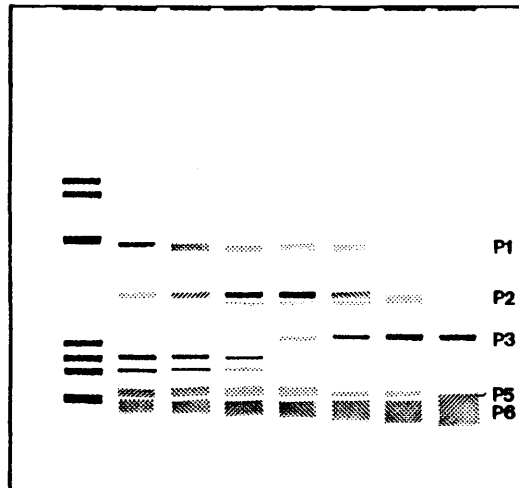


Fig. 34.- Digestión triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 realizada a 13°C (relación Tripsina/DNA= 1:300). Esquema de las imágenes electroforéticas obtenidas a los siguientes tiempos (de idq. a dcha.): 0, 1h, 2h, 3h, 4.5h, 6,5h, 24h y 49h.

de incubación sólo son visibles los péptidos P3 y P6 (figura 34).

3.2.3. Hidrólisis con desoxiribonucleasa I de digeridos trípticos de cromatina

Para averiguar la protección conferida al DNA por las histonas y sus productos de degradación en distintas etapas de proteólisis, se sometió a hidrólisis con DNasa I a digeridos tomados a distintos tiempos de incubación tríptica de cromatina. Esta última se realizó a 13°C en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 empleando una relación tripsina/DNA igual a 1/300. Las alícuotas se tomaron a los tiempos indicados en el pie de la figura 34 en la que se muestra un esquema del estado de las histonas en cada caso. Cada una de éstas alícuotas se incubó durante 2 minutos con DNasa I como se indica en el apartado 2.7.

La figura 35 muestra la distribución de bandas obtenida en un gel de poliacrilamida realizado en condiciones desnaturalizantes según se especifica en el apartado 2.11.1.4. En los primeros tiempos de incubación tríptica (1, 2 y 3 horas) los hidrolizados con DNasa I tienen una distribución de bandas análoga a la obtenida en cromatina sin digerir, aunque están ausentes las bandas de mayor peso molecular (90 y 100 bases). Durante este periodo la imagen electroforética de las histonas corresponde a la denominada segunda etapa de hidrólisis tríptica. Entre 4.5 y 6,5 horas se observa un descenso en el número de bandas de mayores pesos moleculares, siendo sólo visibles los fragmentos de 20, 30 y 40 bases. Entre 24 y 49 horas la banda de mayor peso molecular presente es la de 30 bases. A partir de las 4,5 horas de incubación no queda ya ninguna histona intacta y la digestión tríptica

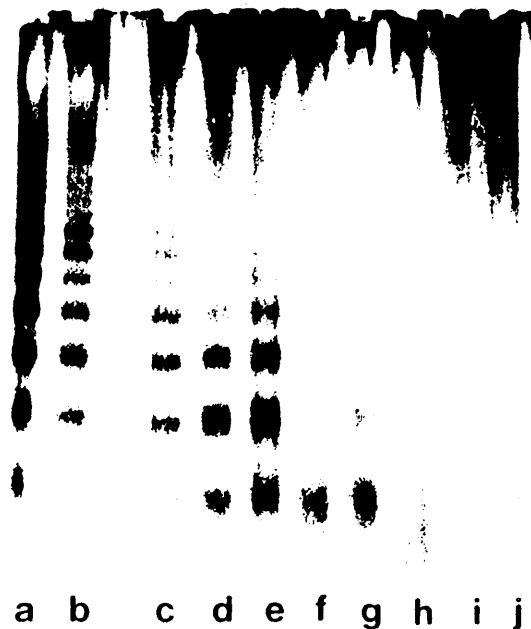


Fig. 35.- Imagen electroforética obtenida en condiciones desnaturalizantes (apartado 2.11.1.4.) de los digeridos tripticos de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (Relación tripsina/DNA = 1:300; T=13°C) obtenidos a tiempos variables. Cada hidrolizado se incubó posteriormente durante 2 min a 37°C con DNasa I (80 U/mg DNA)

a)	cromatina nativa incubada con DNasa I
b)	digerido triptico (t=0) incubado con DNasa I
c)	" " (t=1h) " " "
d)	" " (t=2h) " " "
e)	" " (t=3h) " " "
f)	" " (t=4,5h) " " "
g)	" " (t=6,5h) " " "
h)	" " (t=24h) " " "
i)	" " (t=49h) " " "
j)	" " (t=49h) " " "

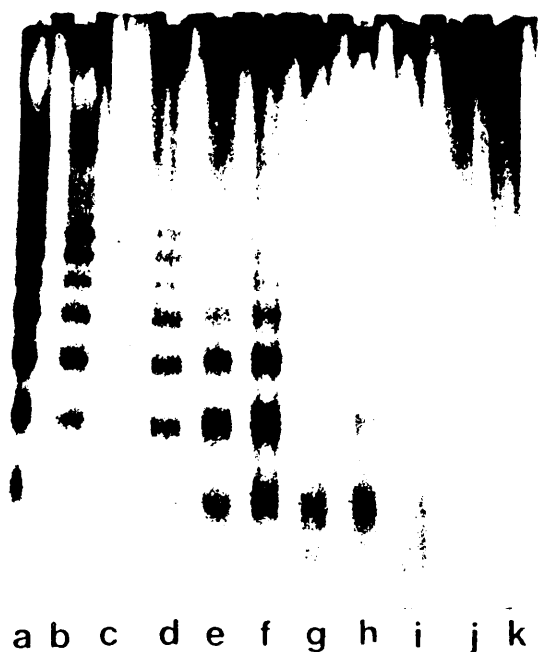


Fig. 36.- Imagen electroforética obtenida en condiciones desnaturantes (apartado 2.11.1.4.) de los digeridos tripticos de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM, EDTA 1mM y ClNa 60mM a pH=8.0. (Relación tripsina/DNA = 1:300; T =13°C) obtenidos a tiempos variables. Cada hidrolizado se incubó posteriormente 2 min a 37°C con DNasa I (80 U/mg DNA).
a) y k) cromatina nativa incubada con DNasa I
b) digerido triptico (t=0) incubado con DNasa I
c) " " (t=1h) " " "
d) " " (t=2h) " " "
e) " " (t=3h) " " "
f) " " (t=4.5h) " " "
g) " " (t=6.5h) " " "
h) " " (t=24h) " " "
i) " " (t=49h) " " "
j) " " (t=49h) " " "

se encuentra en la tercera fase descrita de proteólisis, en la cual la organización del DNA dentro de cada nucleosoma ha tenido que experimentar ya alteraciones como lo indica el hecho de que el fragmento de mayor longitud protegido ante el ataque de la DNasa I posea tan solo 40 bases.

En la figura 36 se muestra el resultado de un experimento realizado del mismo modo que el descrito anteriormente con la diferencia de haber realizado la incubación triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM, EDTA 1mM y ClNa 60mM a pH=8.0. En este caso se obtienen resultados análogos hasta las 4,5 horas de incubación; a partir de este tiempo es apreciable la presencia de un mayor número de bandas de alto peso molecular. A las 6,5 horas están todavía presentes fragmentos de 50-60 bases y a las 24 y 49 horas la intensidad de la banda de 30 bases es mayor que el experimento anterior. Esto indica una mayor protección del DNA ante la DNasa I en los digeridos tripticos obtenidos en presencia de ClNa 60mM.

3.2.4. Hidrólisis con nucleasa de micrococos de cromatina digerida con tripsina

La hidrólisis con nucleasa de micrococos se realizó de un digerido triptico de cromatina en tampón Tris 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 utilizando una relación tripsina/DNA igual a 1/600 durante 120 horas a la temperatura de 4°C. Su imagen electroforética (figura 33 j) denota que ninguna de las fracciones de histona permanece intacta. La hidrólisis posterior de éste digerido con nucleasa de micrococos indicó la longitud de DNA protegido por las zonas resistentes de las histonas no hidrolizadas por la tripsina.

En la figura 18 (b y c) se muestra la imagen electroforética obtenida en geles realizados en condiciones no desnaturalizantes del digerido triptico hidrolizado con nucleasa micrococal. (40 unidades de enzima/mg de DNA) durante 5 y 1 minutos respectivamente; puede observarse que el tamaño de los fragmentos de DNA son, en ambos casos, menores que los obtenidos en el digerido de cromatina nativa (figura 18 a) aún cuando en este caso el tiempo de incubación fué mas largo (10 minutos).

En la figura 18 se indica asimismo el tamaño de los fragmentos de DNA que son, en el caso del hidrolizado durante un minuto, 166 y 140 pares de bases, que corresponden a la longitud del DNA del cromosoma y del core nucleosomal respectivamente, ésto es prueba de que, aún cuando todas las histonas han sido hidrolizadas por la tripsina, sus fragmentos resistentes que permanecen asociados al DNA son capaces de conferirle protección y mantener en cierto grado su estructura. El fragmento de 140 pares de bases no es, sin embargo, mas que un producto intermedio, ya que en el hidrolizado durante 5 minutos aparecen otros fragmentos de 117 y 105 pares de bases. El fragmento de 105 pares de bases parece ser el de menor longitud protegido por las zonas resistentes de las histonas.

3.2.5. Cinéticas de hidrólisis triptica seguidas mediante titulación automática

La hidrólisis triptica de enlaces peptídicos en que el grupo carboxilo es aportado por un residuo de lisina o arginina, da lugar a la liberación de un protón por cada enlace roto que puede valorarse mediante el empleo de una base.

Antes de estudiar la rotura triptica de enlaces en cromatina se digirieron con tripsina histonas en disolución acuosa. En este medio es de esperar que las histonas no posean estructura secundaria y por ello resulten accesibles al enzima todos los enlaces susceptibles de ser hidrolizados. Las histonas utilizadas procedían de la extracción con ClH 0,25N del sedimento resultante del tratamiento de núcleos con PCA 5% como se indica en el apartado 2.4.

La disolución de las histonas se realizó a una concentración de 0,05 mg/ml en agua a pH=7,95; la digestión triptica se efectuó empleando una relación Tripsina/proteína igual a 1/300. La titulación se realizó de modo automático en las condiciones indicadas en el apartado 2.9.

La curva obtenida (figura 37) es de tipo exponencial y responde a la ecuación:

$$H_t = H_1 (1 - e^{-k_1 t})$$

donde H_t es el número de microequivalentes de NaOH consumidos a tiempo t por cada miligramo de proteína; H_1 es el número de micro equivalentes de NaOH consumidos en total como consecuencia de la rotura de todos los enlaces por miligramo de proteína; k_1 es la constante de hidrólisis y t el tiempo.

Su análisis se realizó por el método gráfico mediante la re presentación de los logaritmos neperianos de $(H_1 - H_t)$ frente al tiempo (figura 38); los valores obtenidos para H_1 y k_1 son, respectivamente, 1,3 microequivalentes/mg y $1.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

La hidrólisis triptica de cromatina se realizó en disolución acuosa (pH = 7.95) a una concentración de 0,12 mg de DNA por mi-

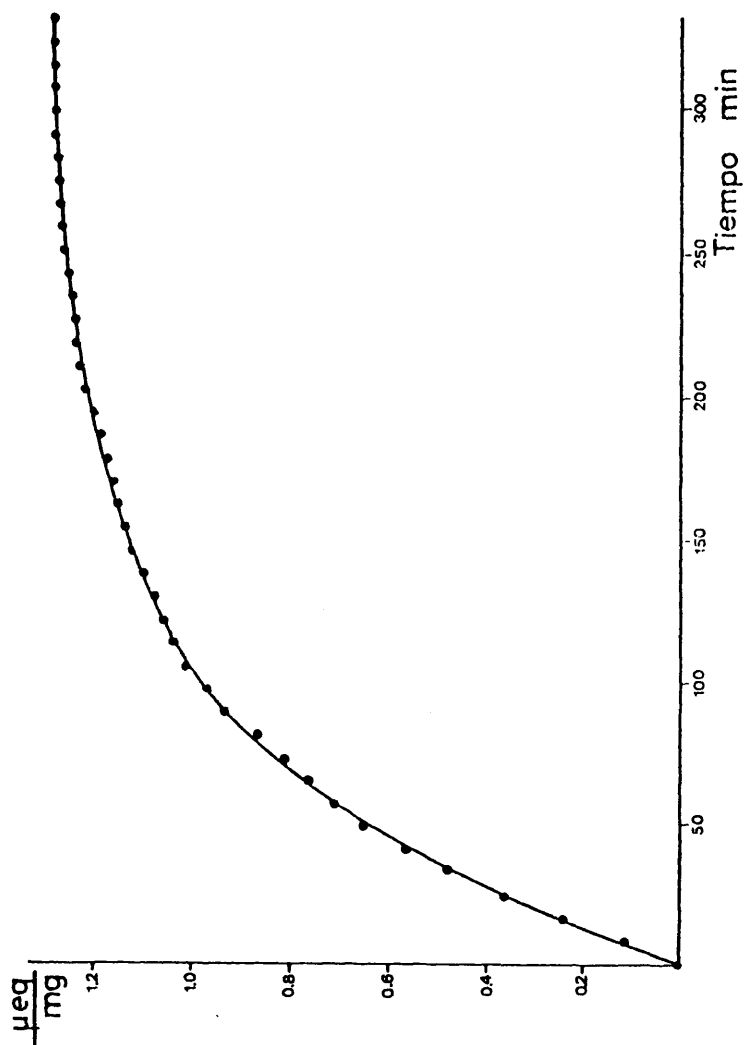


Fig. 37.- Hidrólisis triptica de histonas en disolución acuosa (0.05 mg/ml) a pH=7.95 seguida mediante titulación automática (apartado 2.9); relación tripsina/proteína= 1:300. En ordenadas se expresan los microequivalentes de NaOH 4.5mM consumidos por miligramo de proteína.

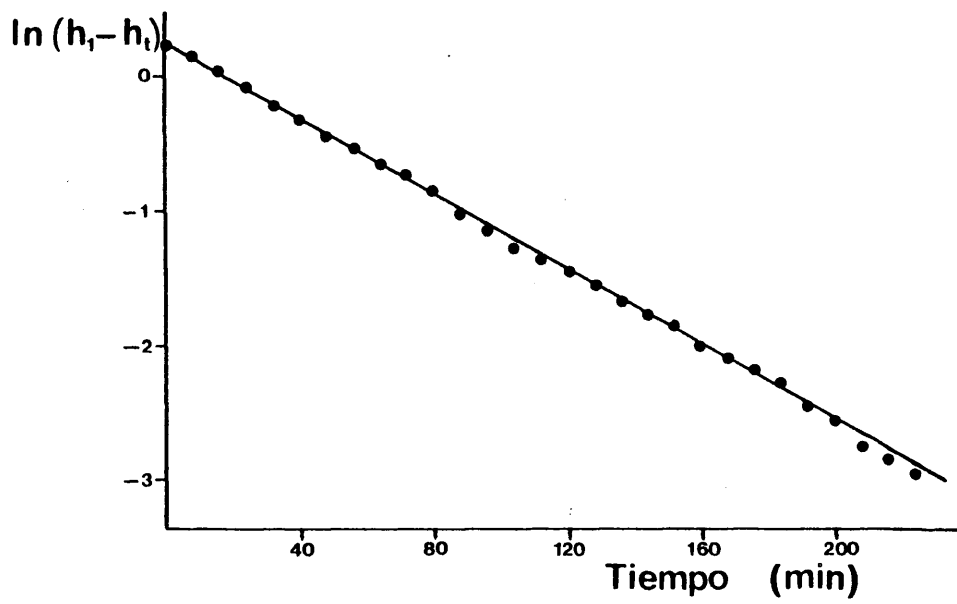


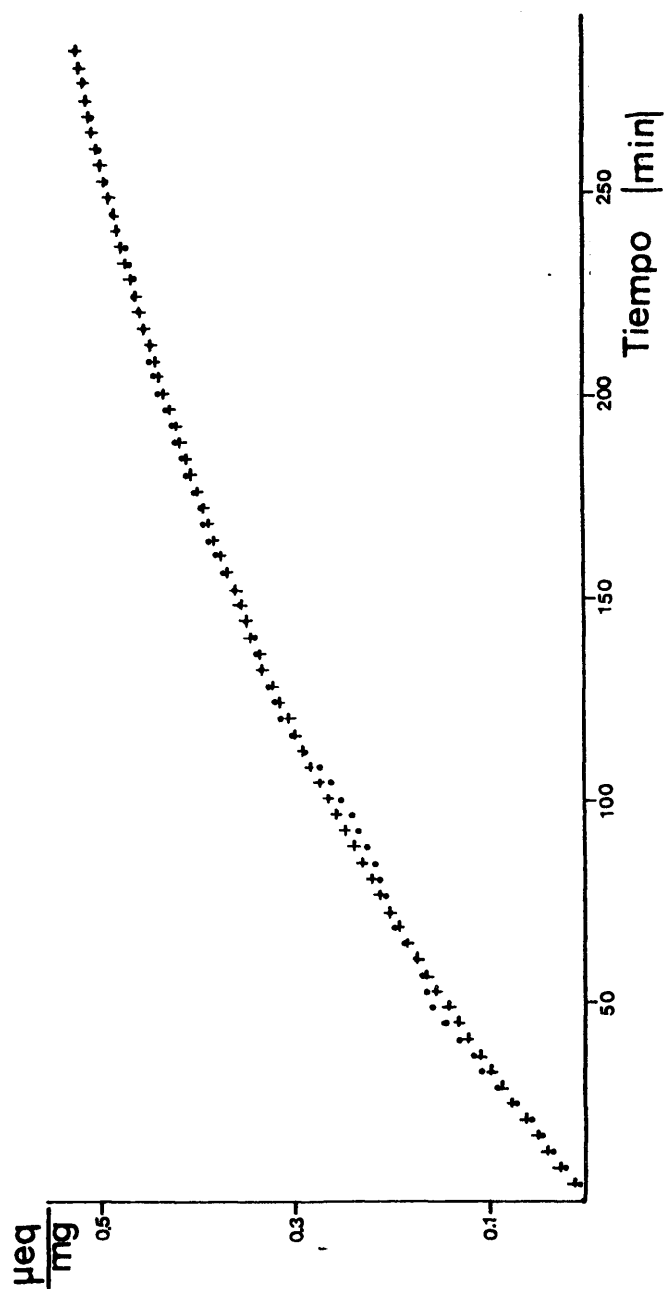
Fig. 38..- Análisis gráfico (apartado 2.11.5.1.1.) de la curva mostrada en la figura 37.

lilitro, empleando una relación enzima/DNA de 1/300. Las condiciones de incubación y de titulación fueron las mismas que en el caso anterior. La curva obtenida (figura 39) se ajustó mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.) a una curva teórica de una exponencial cuyos parámetros H_1 y k_1 son, respectivamente 0,72 microequivalentes/mg de DNA y $4.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. La representación de los residuos obtenidos en dicho ajuste frente a sus probabilidades normales se muestra en la figura 40.

Si se comparan los valores obtenidos de H_1 y k_1 en la hidrólisis trípica de histonas y cromatina en disolución acuosa, puede observarse que el consumo de NaOH en el caso de cromatina es aproximadamente el 55% del que se produce por hidrólisis de enlaces en las histonas libres; esto indica una protección ante el enzima de casi la mitad de los enlaces potencialmente hidrolizables en cromatina. Por otra parte, la velocidad de rotura enzimática de enlaces en cromatina es, aproximadamente, tres veces más pequeña que la obtenida en el caso de la proteólisis de las histonas como se deduce de los correspondientes valores de k_1 . Este resultado es totalmente lógico si se tiene en cuenta que la interacción de las histonas con el DNA en la cromatina no solo impide que todos los enlaces peptídicos sean accesibles sino que también dificulta, posiblemente por razones geométricas, el acceso de la tripsina a los enlaces potencialmente hidrolizables.

3.2.6. Cinéticas de hidrólisis trípica seguidas por dicroismo circular

La proteólisis producida en las histonas en el transcurso de las incubaciones trípicas de cromatina, da lugar a cambios con-



124

Fig. 39.- Hidrólisis triptica de cromatina en disolución acuosa (0,12 mg/ml) a pH=7.95 seguida mediante titulación automática (apartado 2.9.); relación tripsina/DNA = 1:300. En ordenadas se expresan los microequivalentes de NaOH 4.5 mM consumidos por miligramo de DNA.
 • curva experimental
 + curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.1.2.).

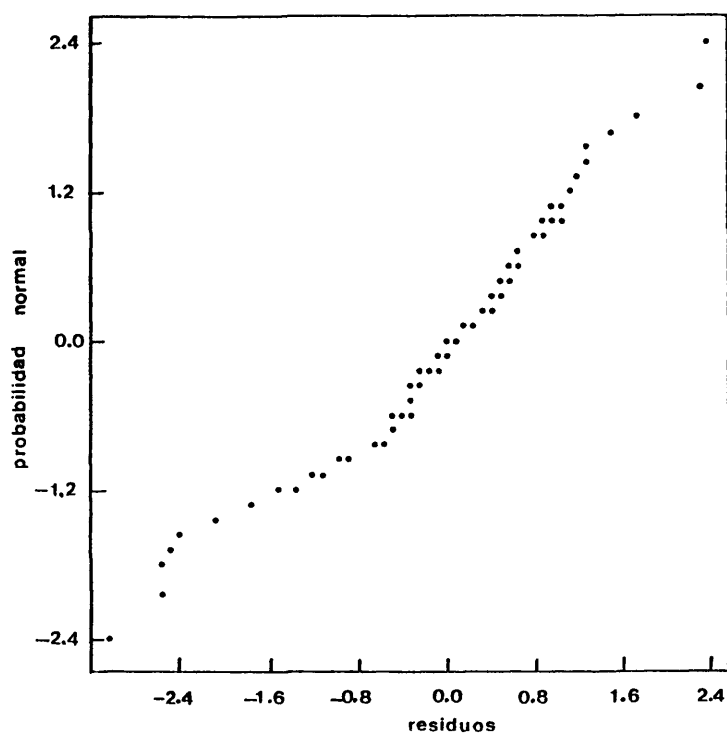


Fig. 40.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico de la figura 39 frente a sus probabilidades normales.

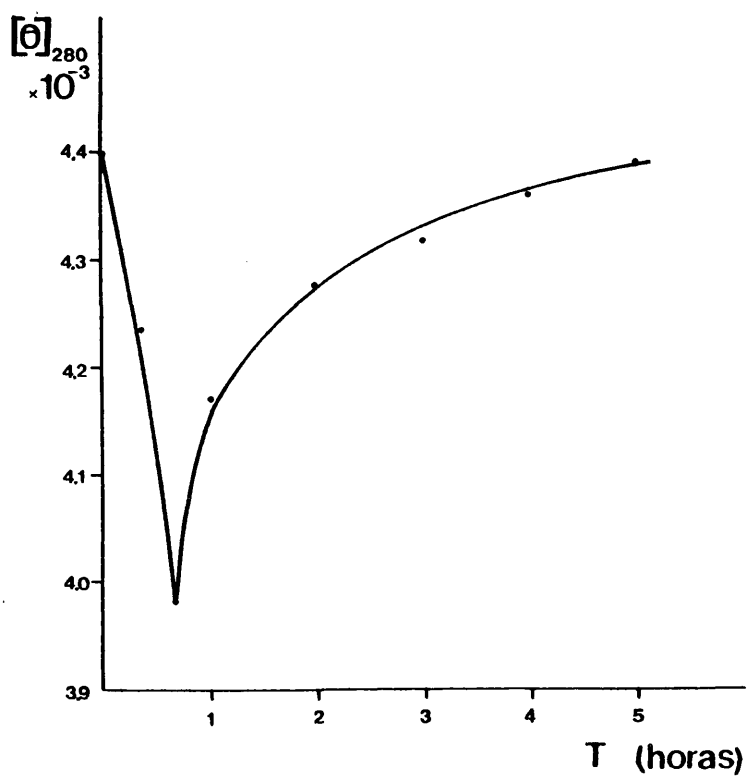


Fig. 41.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm durante el curso de la digestión triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (0.25 mg/ml) a 4°C. Relación tripsina/DNA = 1/1000.

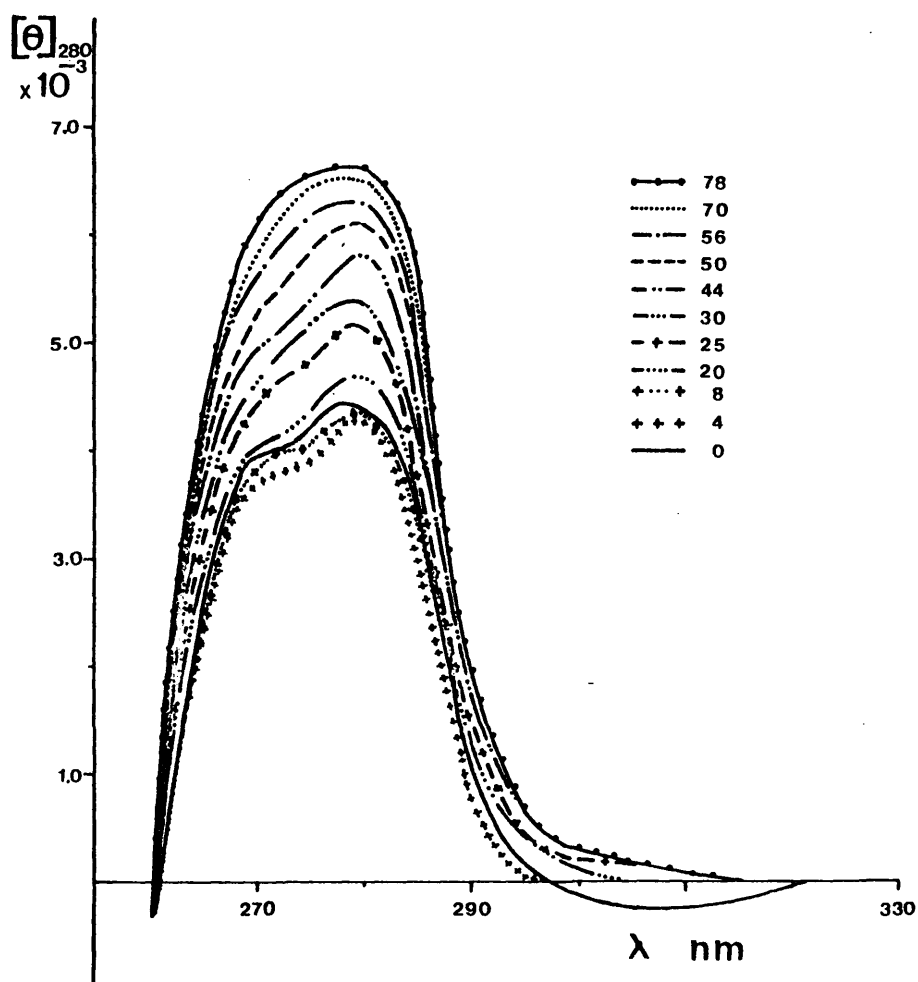


Fig. 42.- Espectros de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo de alícuotas tomadas en el transcurso de la incubación de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (0.25 mg/ml) con tripsina a 4°C; relación tripsina/DNA = 1/1000. En el ángulo superior derecho se indican los tiempos de incubación en horas.

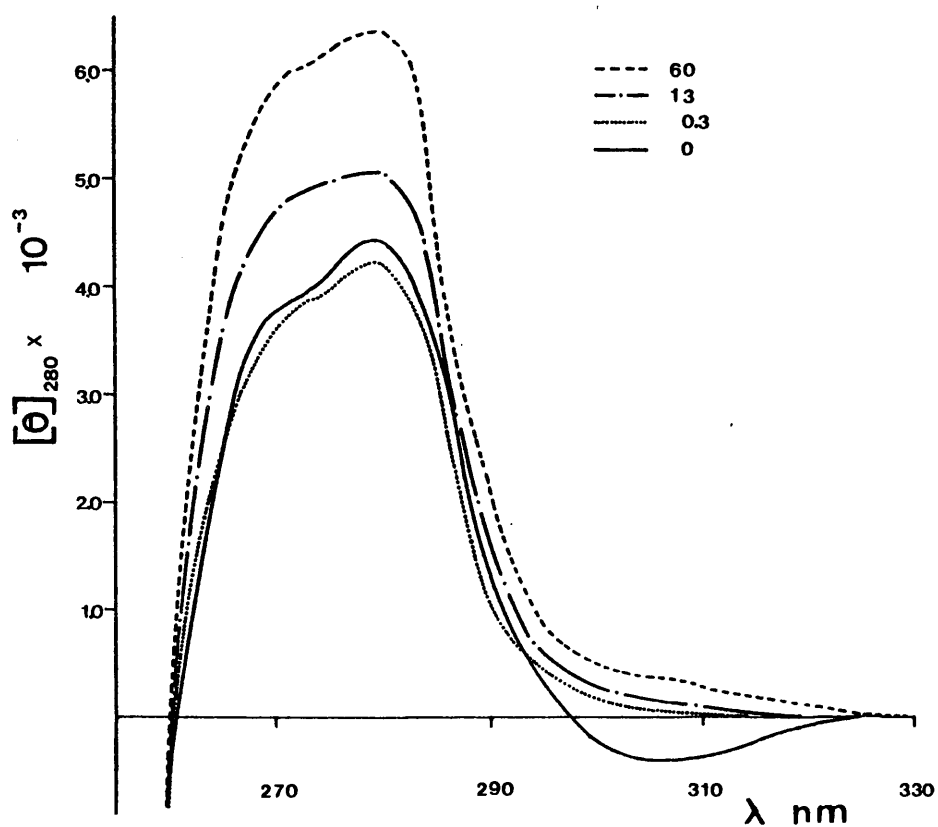


Fig. 43.- Espectros de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo de alícuotas tomadas en el transcurso de la incubación de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (0.25 mg/ml) con tripsina a 4°C; relación tripsina/DNA = 1/1000. En el ángulo superior derecho se indican los tiempos de incubación en horas.

formacionales en el DNA que pueden ponerse de manifiesto utilizando la técnica de dicroísmo circular en la zona del U.V. próximo.

Se han realizado dos tipos de estudio mediante el uso de esta técnica:

- digestiones discontinuas a tiempos discretos de incubación con objeto de relacionar un grado determinado de proteólisis con la variación conformacional experimentada como consecuencia por el DNA.
- digestiones continuas destinadas a obtener los parámetros que caracterizan cinéticamente el proceso en distintas condiciones de experimentación.

3.2.6.1. Digestiones discontinuas.

Se realizaron del modo indicado en el apartado 2.7. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación y se registró su espectro de D.C. en la zona 260-330 nm. El estado de las histonas en cada caso se determinó mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida en presencia de SDS.

En las figuras 41, 42 y 43 se muestran los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes realizados en las mismas condiciones; la cromatina disuelta en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0, a una concentración de DNA de 0,25 mg/ml se incubó con tripsina empleando una relación enzima/DNA igual a 1/1000 (P/p), a 4°C durante los tiempos indicados en cada caso en el pie de la figura.

En la figura 41 puede observarse que, en estas condiciones, se produce a tiempos cortos de incubación un pequeño descenso de

la elipticidad a 280 nm; este descenso alcanza, con respecto a la elipticidad inicial, un valor máximo de $-400 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ a los 40 minutos de incubación. El valor inicial no se recupera hasta las 5-8 horas de incubación (figuras 41 y 42). El descenso de elipticidad en los primeros momentos de proteólisis solo ha sido observable en incubaciones realizadas en condiciones muy suaves; si se emplea una relación enzima/DNA mayor (1/600) se aprecia ya en el primer tiempo analizado (3 horas) el aumento de la elipticidad a 280 nm (figura 44). Esto también ocurre en una hora en otra incubación realizada a 13°C utilizando una relación enzima/DNA de 1/300 (figura 45). Por otra parte, al digerir con tripsina cromatina liberada de histonas H1/H5 en condiciones muy suaves (relación enzima/DNA igual a 1/1000 y temperatura de incubación 4°C) figura 46, no se apreciaba el descenso de elipticidad a tiempos cortos. Este descenso debe estar relacionado, por tanto, con la proteólisis de las histonas ricas en lisina que se produce en tiempos muy breves de incubación. Una vez superada esta etapa, se produce, en todas las condiciones estudiadas, un aumento progresivo de la elipticidad a 280 nm y una alteración en la forma del espectro que se hace cada vez mas semejante al correspondiente al DNA libre. En primer lugar, se pierde el mínimo existente en la zona 290-320 nm, que es característico de cromatina nativa y después, de forma gradual, desaparece el hombro a 273 nm y el máximo de elipticidad a 280 nm se desplaza hacia 275 nm.

La representación de la elipticidad a 280 nm frente al tiempo de incubación de los espectros mostrados en la figura 44 da lugar a la obtención de una curva de tipo exponencial (figura 47) cuyo análisis gráfico (apartado 2.11.5.2.1.) indica que es la re

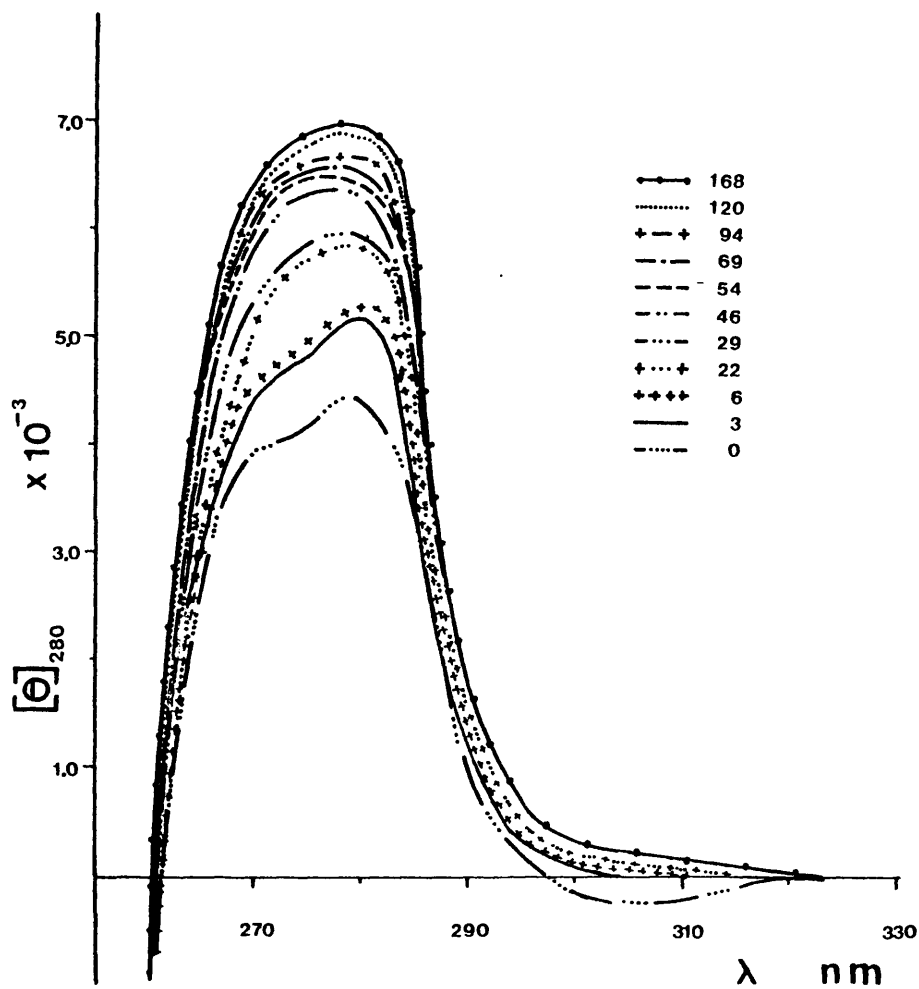


Fig. 44.- Espectros de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo de alícuotas tomadas en el transcurso de la incubación de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (0.25 mg/ml) con tripsina a 4°C; relación tripsina/DNA=1/600. En el ángulo superior derecho se indican los tiempos de incubación en horas.

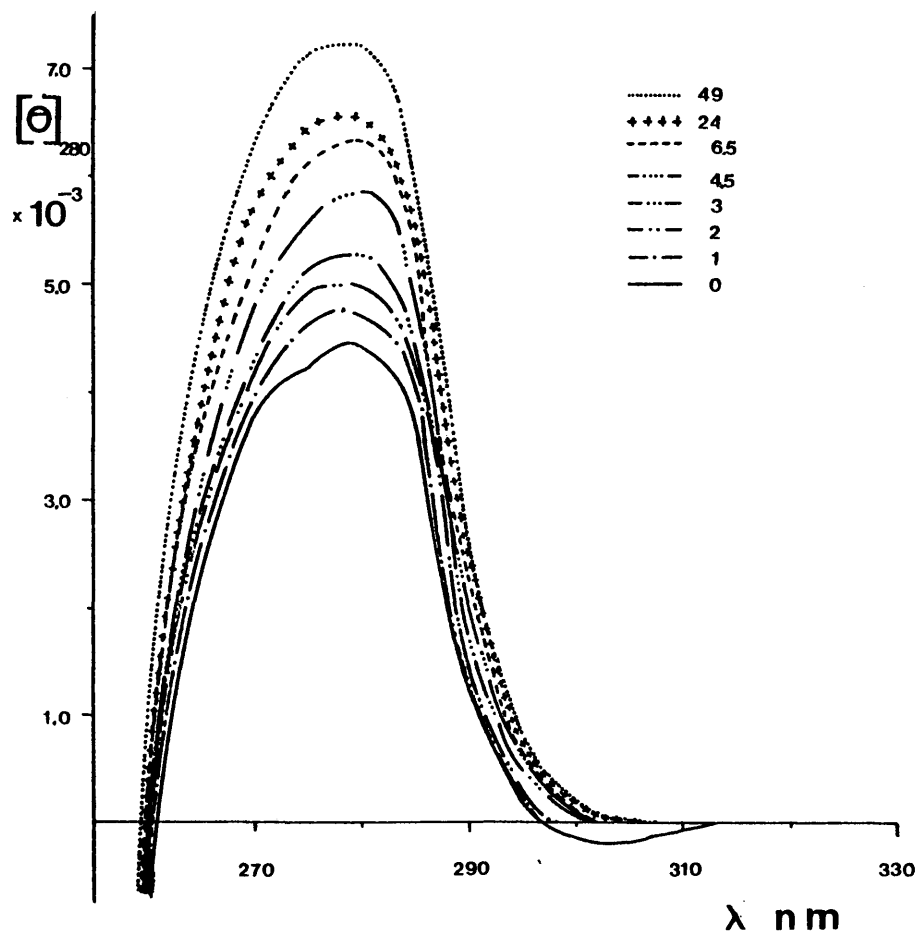


Fig. 45.- Espectros de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo de alícuotas tomadas en el transcurso de la incubación de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (0.25 mg/ml) con tripsina a 13°C; relación tripsina/DNA=1/300. En el ángulo superior derecho se indican los tiempos de incubación en horas.

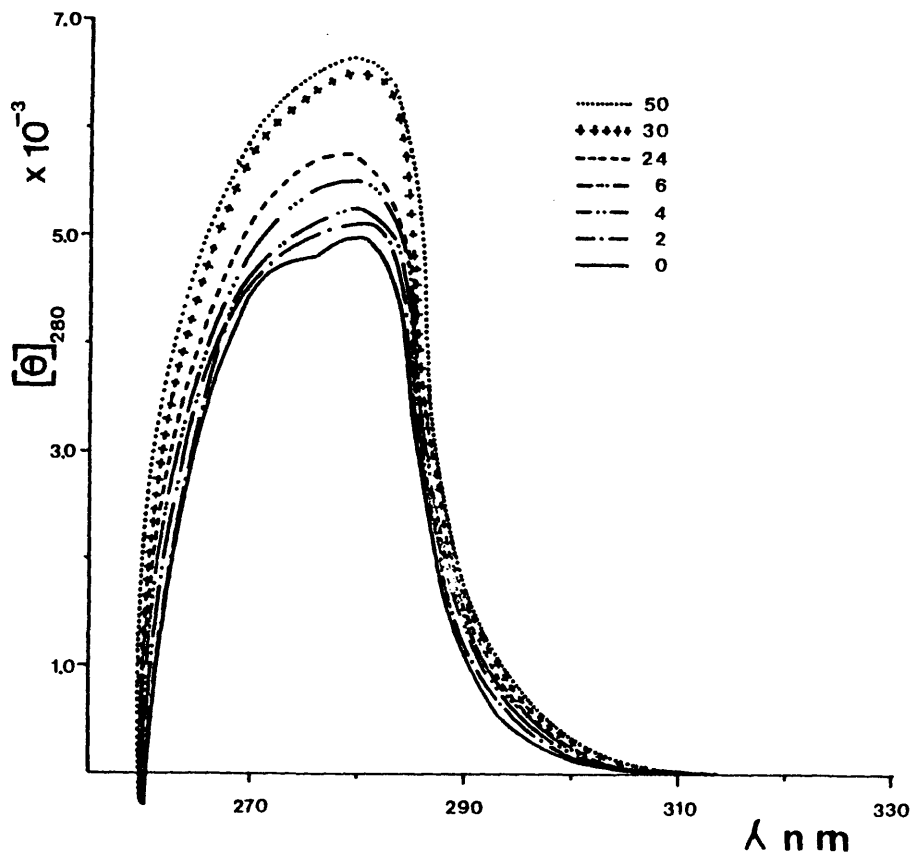


Fig. 46.- Espectros de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo de alícuotas tomadas en el transcurso de la incubación de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 (0.25 mg/ml) con tripsina a 4°C; relación tripsina/DNA= 1/1000. En el ángulo superior derecho se indican los tiempos de incubación en horas.

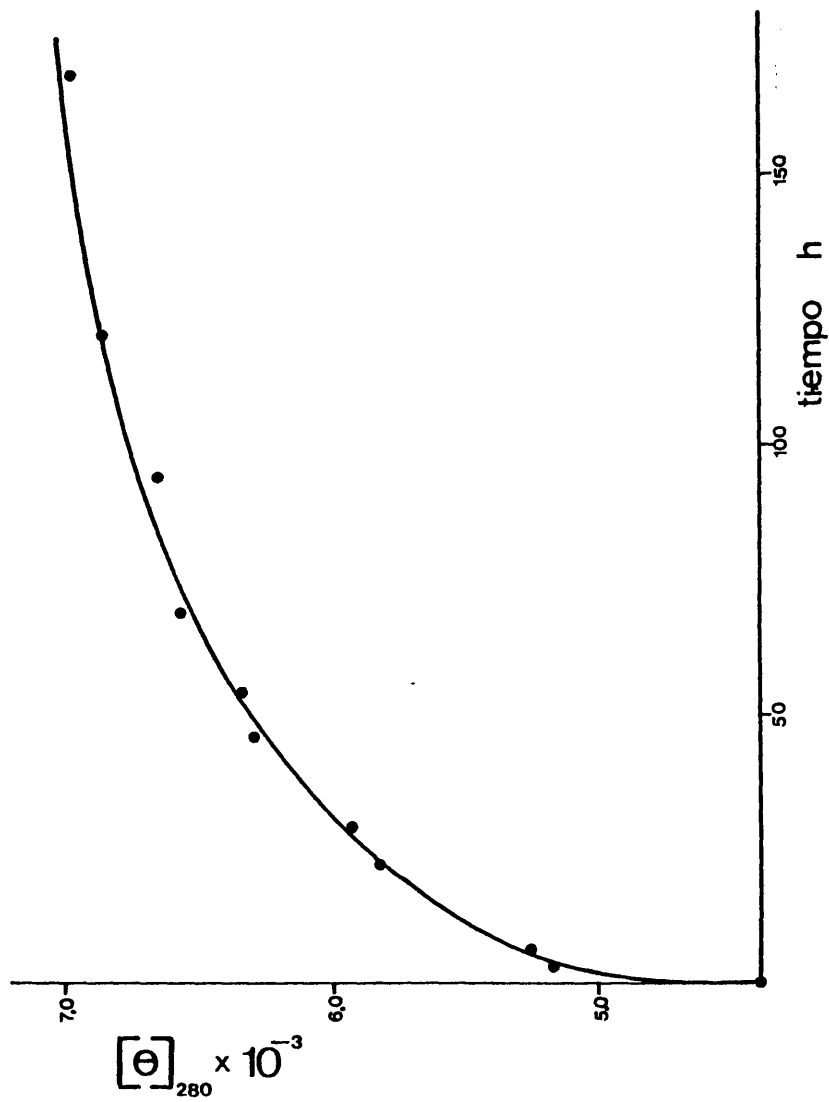


Fig. 47.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión triptica de cromatina cuyos espectros de dicroísmo circular se muestran en la figura 44.

sultante de la suma de dos procesos simultáneos, ambos de tipo exponencial, caracterizados por constantes cinéticas diferentes.

Los valores de las constantes de pseudo-primer orden obtenidos por el análisis gráfico son $k_1 = 5,5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ y $k_2 = 3,4 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$. A partir de las ordenadas en el origen, como se ha indicado en el apartado 2.11.5.2.1. se han determinado los valores de Θ_1 y Θ_2 que resultan ser de 1,519 y 1,908 $^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$ respectivamente.

3.2.6.2.- Digestiones contínuas

Los experimentos de digestiones tripticas discontinúas indicados en el apartado anterior proporcionan un número insuficiente de puntos experimentales para construir las representaciones de Θ_{280} frente al tiempo necesarias para el cálculo de los parámetros cinéticos. Para el cálculo de dichos parámetros se realizaron digestiones en las que se midió la Θ_{280} contínuamente durante todo el proceso de incubación; estos experimentos se llevaron a cabo según el método y condiciones descritas en el apartado 2.10.

Las digestiones tripticas contínuas se llevaron a cabo en cromatina nativa de las características indicadas en el apartado 3.1. y en cromatina desprovista de histonas H1/H5 por el procedimiento de disociación salina (apartado 3.1.7.1.) y, en ambos casos, se realizaron un conjunto de experimentos en los que se mantuvo constante la relación tripsina/DNA (1/25) y temperatura de incubación alterándose tan sólo la fuerza iónica del medio en el intervalo de concentraciones de ClNa de 0 a 100 mM; como se ha discutido en el apartado 3.1.8., en éste intervalo de fuerzas iónicas, y en las condiciones utilizadas en estos experimentos, no

se produce la precipitación de la cromatina que podría dificultar el desarrollo de las incubaciones e inducir a error en la interpretación de los resultados.

3.2.6.2.1.- Digestiones continuas de cromatina nativa.

La representación directa de la Θ_{280} frente al tiempo dió lugar a la obtención de curvas bifásicas en los casos en que la fuerza iónica del medio de incubación fue menor que la correspondiente a ClNa 10mM (figuras 48 y 49); en los experimentos realizados en presencia de mayores concentraciones salinas, como se mostrará más adelante, no fue patente dicha bifasicidad.

Para el cálculo de parámetros cinéticos se ajustaron todas las curvas experimentales obtenidas a la curva teórica mas adecuada en cada caso mediante el empleo de un programa de cálculo. En los casos citados en que la curva experimental resultó bifásica solo se introdujo en el programa de cálculo la primera parte de la curva anterior al punto de inflexión. Como se ha indicado en el apartado 2.11.5.2.1. el programa utilizado realiza el ajuste de cada curva experimental a curvas de 1, 2, 3 ó 4 exponenciales. La selección del ajuste idóneo se realizó en cada caso siguiendo el procedimiento que se indica a continuación.

Primeramente se descartaron aquellos ajustes carentes de sentido, bien por ser una o varias de sus constantes cero, bien por resultar nula o casi nula la ordenada en el origen correspondiente a la exponencial regida por una constante significativa. Después, entre los restantes ajustes se escogió aquel cuyo valor rms fué mínimo; en el caso de obtener dos o más ajustes con valor rms próximos se seleccionó aquel en que la representación de los re-

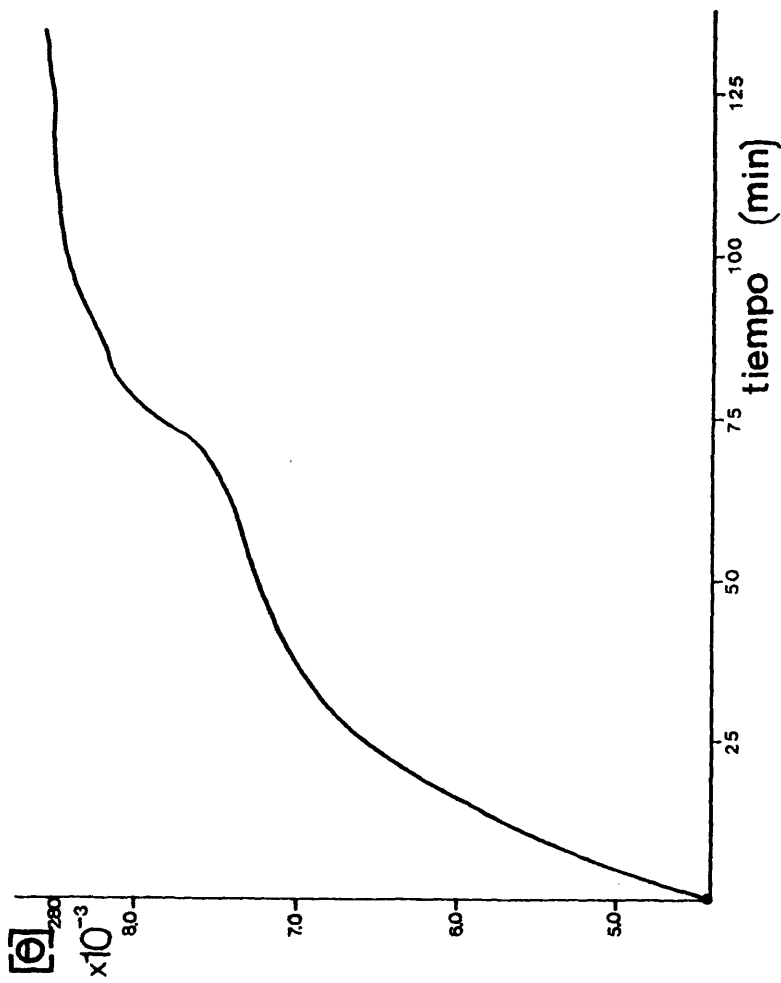


Fig. 48.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo de la digestión triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.

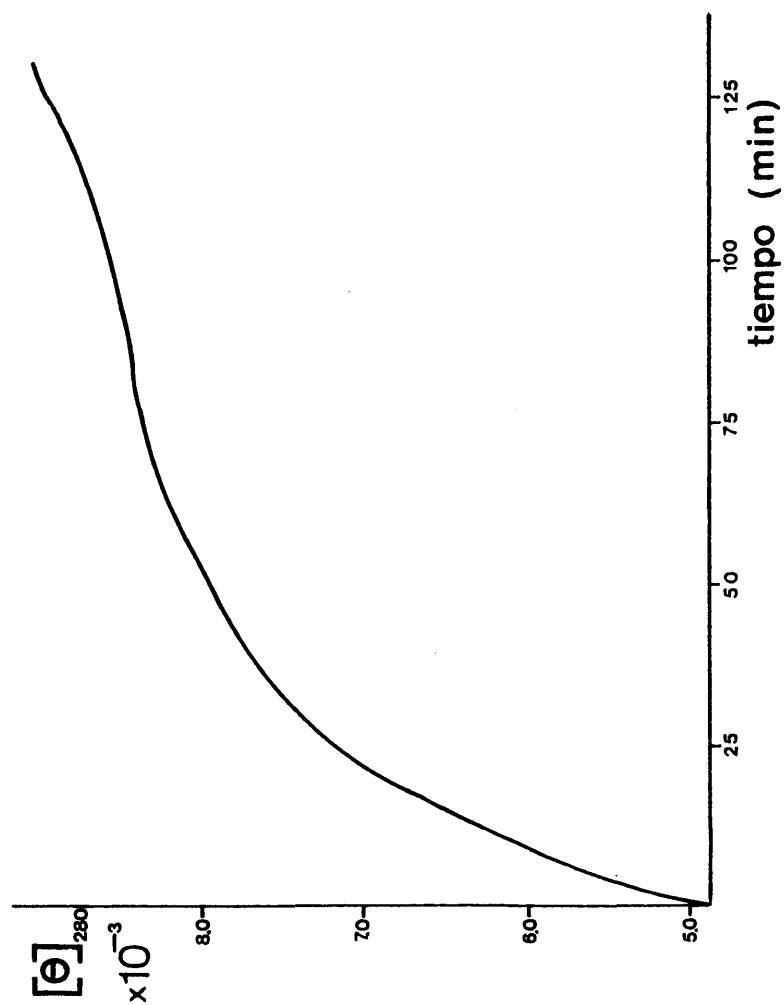


Fig. 49.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 5mM a pH=8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.

siduos frente a su probabilidad normal resultó más lineal.

En las figuras 50 y 51 se muestran las zonas de las curvas experimentales (•) obtenidas en las digestiones tripticas realizadas en ausencia y presencia de ClNa 5mM respectivamente y sus ajustes teóricos correspondientes (+) a curvas de dos exponenciales. Las figuras 52 y 53 corresponden a las representaciones de los residuos frente a su probabilidad normal para ambos ajustes. Los parámetros cinéticos obtenidos en ambos casos de la curva teórica seleccionada se dan, junto con los resultantes de los demás experimentos realizados, en la tabla IV.

La figura 54 ilustra la curva experimental (•) y teórica (+) obtenida en una digestión triptica de cromatina realizada en las mismas condiciones que la mostrada en la figura 48 pero en la que se empleó una relación tripsina/DNA igual a 1/300. La curva teórica es una exponencial simple; hay que señalar que en este caso, y debido al empleo de una relación enzima/DNA menor, la cinética de hidrólisis es mucho mas lenta y, como puede observarse si se comparan los valores de Θ_{280} de ambas representaciones, a los 400 minutos de digestión nos encontramos todavía dentro de la zona anterior al punto de inflexión de la curva de la figura 48. La figura 55 ilustra la representación de los residuos del ajuste de la figura 54 frente a sus probabilidades normales.

En las incubaciones realizadas en presencia de concentraciones de ClNa comprendidas entre 10 y 100 mM no se aprecia bifasicidad en las curvas obtenidas en el tiempo que dura el experimento por lo cual se introdujeron todos los puntos experimentales de la curva en el programa de cálculo.

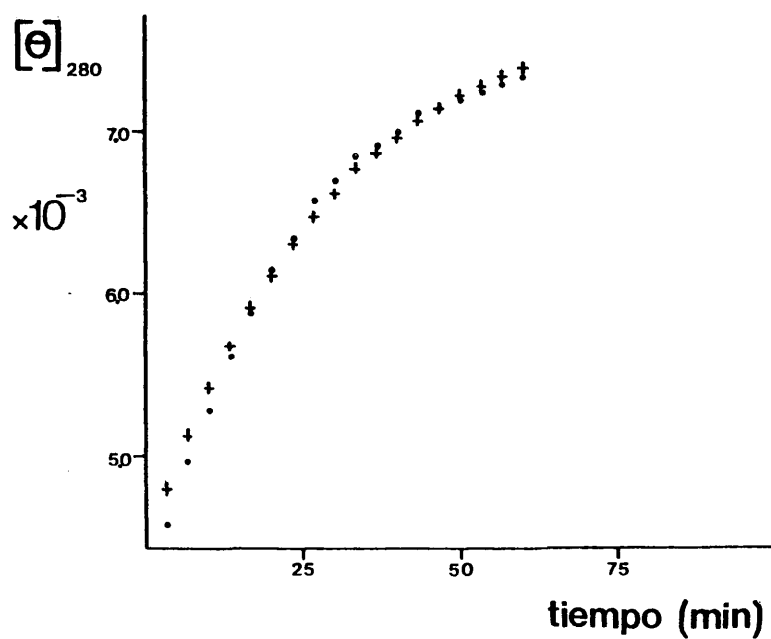


Fig. 50.- Puntos experimentales (.) y teóricos (+) de la primera parte de la curva mostrada en la figura 48. Los puntos teóricos se obtuvieron mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

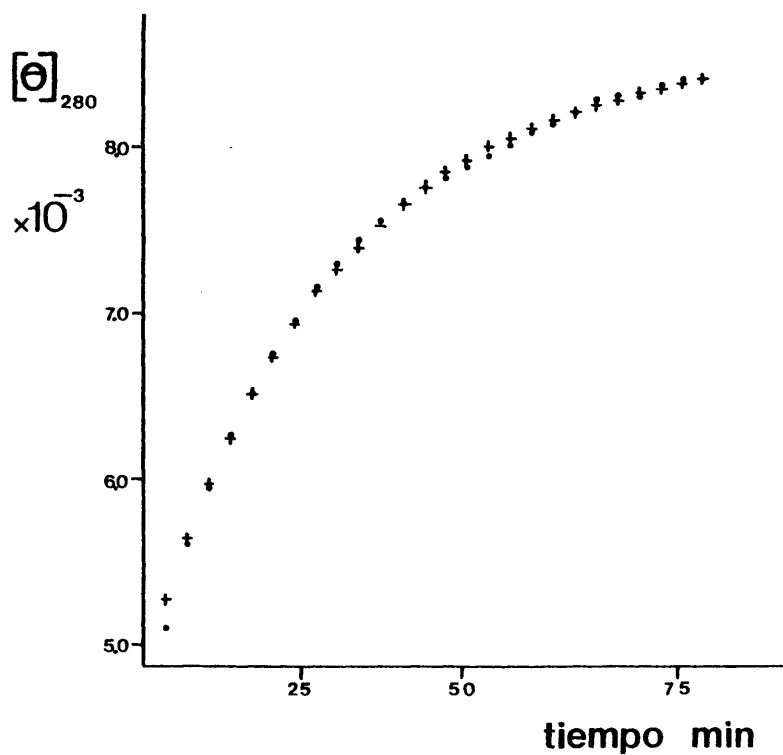


Fig. 51.- Puntos experimentales (.) y teóricos (+) de la primera parte de la curva mostrada en la figura 49. Los puntos teóricos se obtuvieron mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

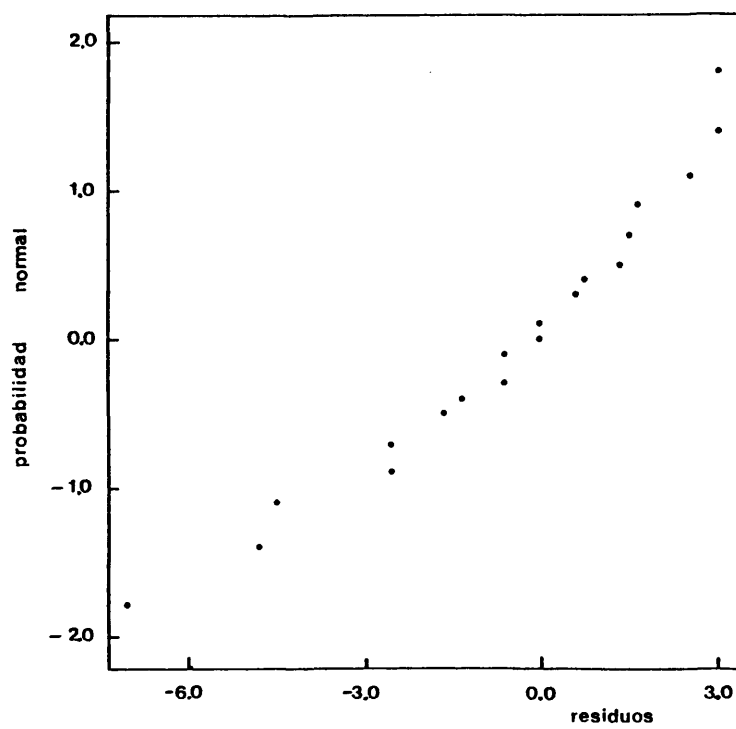


Fig. 52.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva de la figura 50 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

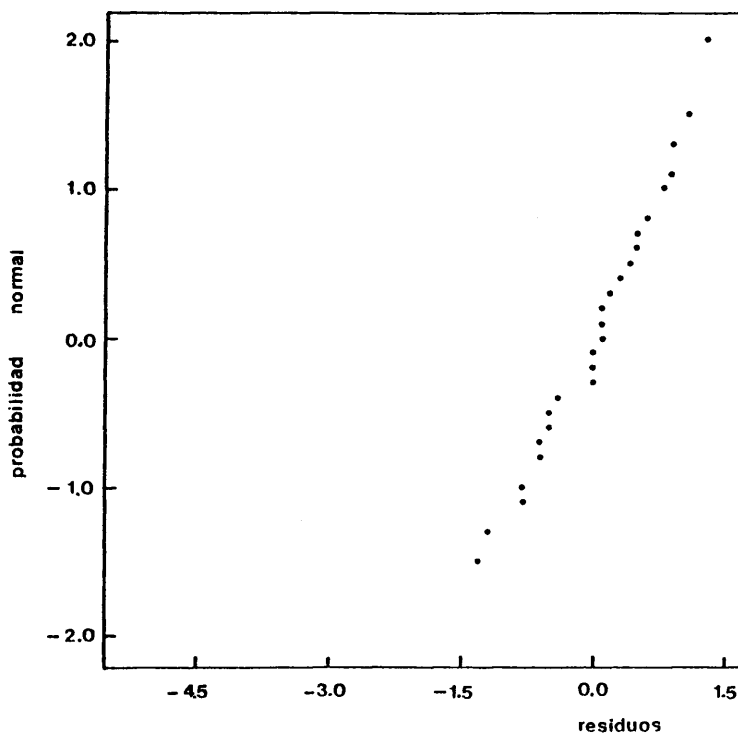


Fig. 53..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 51 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

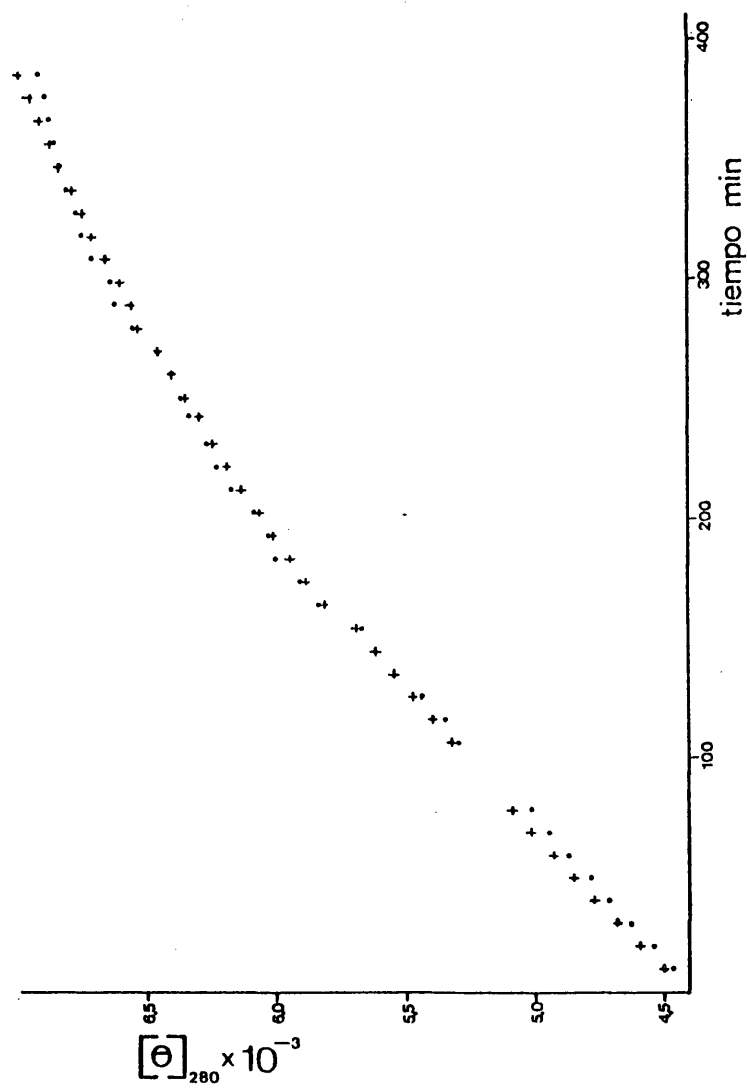


Fig. 54.- Variación de la elipticidad molar en grados x cm²/dmol a 280 nm con el tiempo en la digestión triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA=1/300.

- curva experimental
- + curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

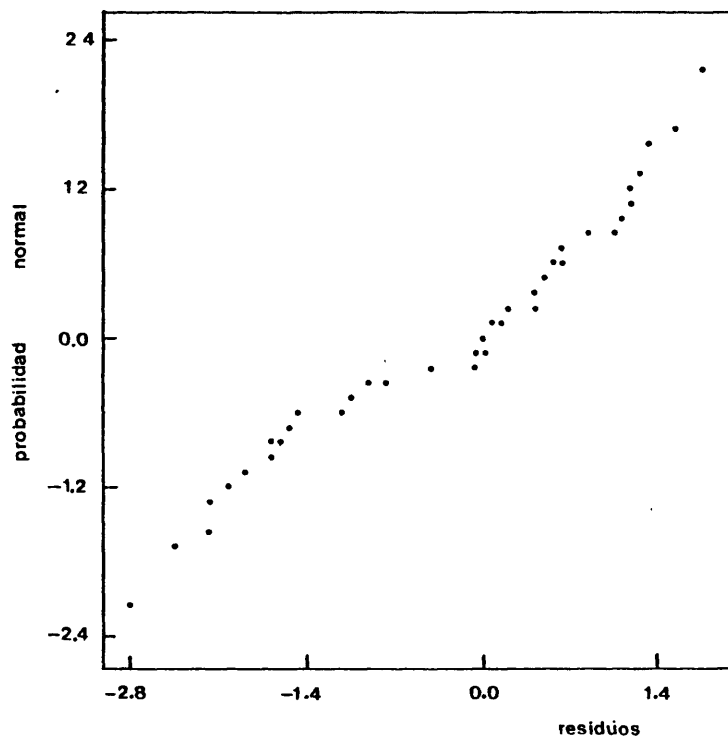


Fig. 55.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a una exponencial de la curva experimental de la figura 54 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.)

En las figuras 56, 58, 60, 62 y 64 se muestran las curvas experimentales (*) y sus ajustes a curvas teóricas de dos exponenciales (+) de las incubaciones realizadas en presencia de ClNa 10, 20, 40, 60 y 100mM respectivamente. En cada caso se incluye la representación correspondiente de sus residuos frente a las probabilidades normales (figuras 57, 59, 61, 63 y 65). Las constantes y ordenadas en el origen de cada curva teórica se recogen en la tabla IV.

Aunque en los casos anteriores no pueda observarse bifasicidad en las curvas experimentales, esto no significa que esta no pudiera producirse; en este sentido hay que hacer notar que en ninguno de los experimentos se ha superado un valor de $[\Theta]_{280}$ de $9000 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ siendo este valor inferior al que corresponde al DNA libre en disolución que se alcanzó después de 48 horas de mantener las incubaciones a temperatura ambiente y que figura en cada caso en la tabla IV bajo la notación $\Theta_{\text{final exp.}}$. Por otra parte, si se suman los valores teóricos de ordenada en el origen Θ_1 y Θ_2 obtenidos para cada curva mediante el programa de cálculo se ve que no se corresponde, en muchos casos, con el valor del incremento de la Θ_{280} alcanzado a las 48 horas ($\Delta\Theta_{\text{total exp.}}$); conviene observar que $\Theta_1 + \Theta_2$ e $\Delta\Theta_{\text{total exp.}}$ se alejan más entre sí en aquellos casos en que la fuerza iónica de incubaciones fué muy baja o alta (tabla IV) y resultó más o menos coincidente a fuerza iónica intermedia (ClNa 10-40 mM). En una digestión triptica realizada en presencia de ClNa 20mM en las mismas condiciones que la mostrada en la figura 58, pero en la que se empleó una relación tripsina/DNA de 1/2,4, no se presenta bifasicidad (figura 66) aún cuando se llegan a superar los $10000 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$, lo que abunda en la idea de que a fuerzas iónicas in-

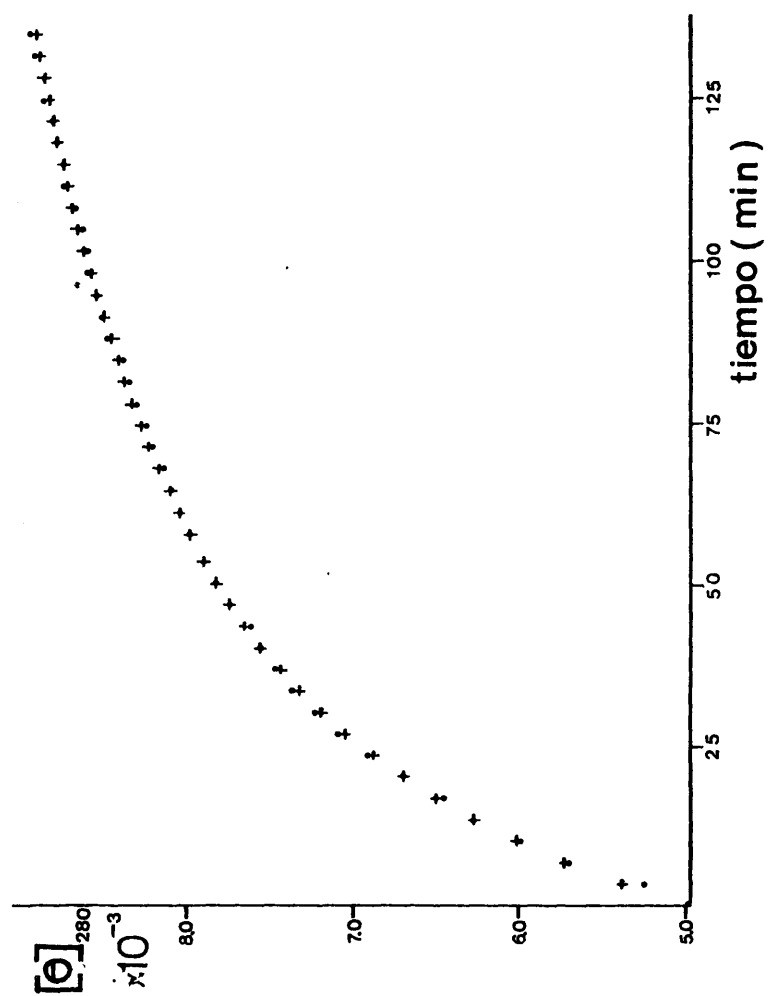


Fig. 56.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión triptica de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 10mM a pH= 8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 • curva experimental
 + curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.)

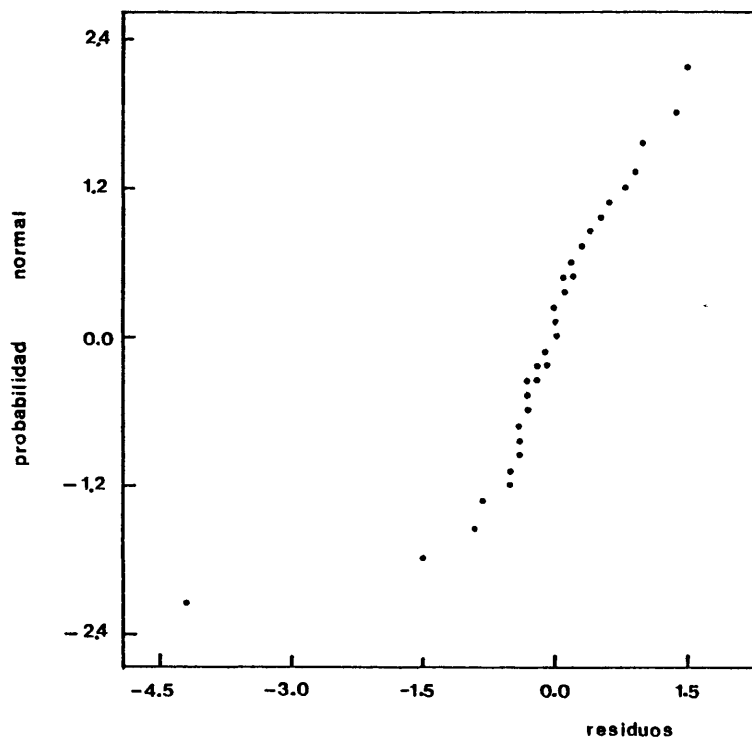


Fig. 57.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 56 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

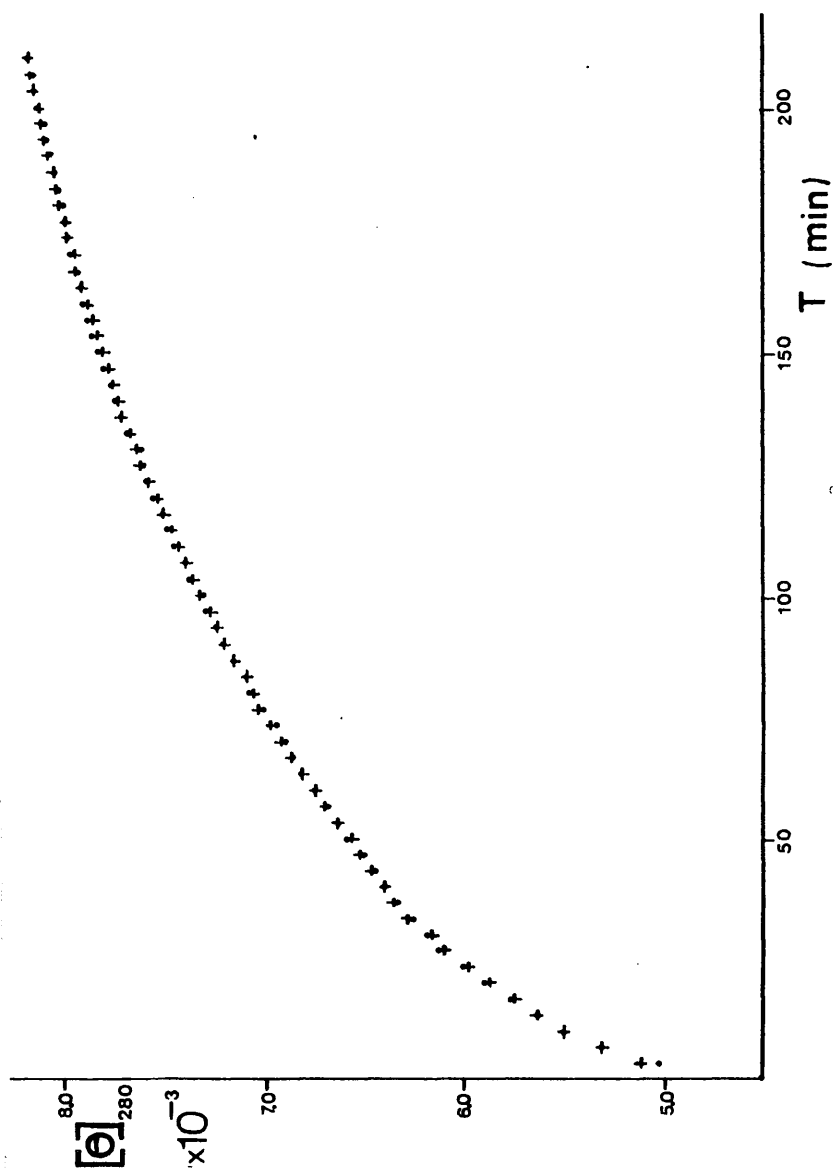


Fig. 58.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo de la digestión con tripsina de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 20mM a pH=8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.

• curva experimental
+ curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.)

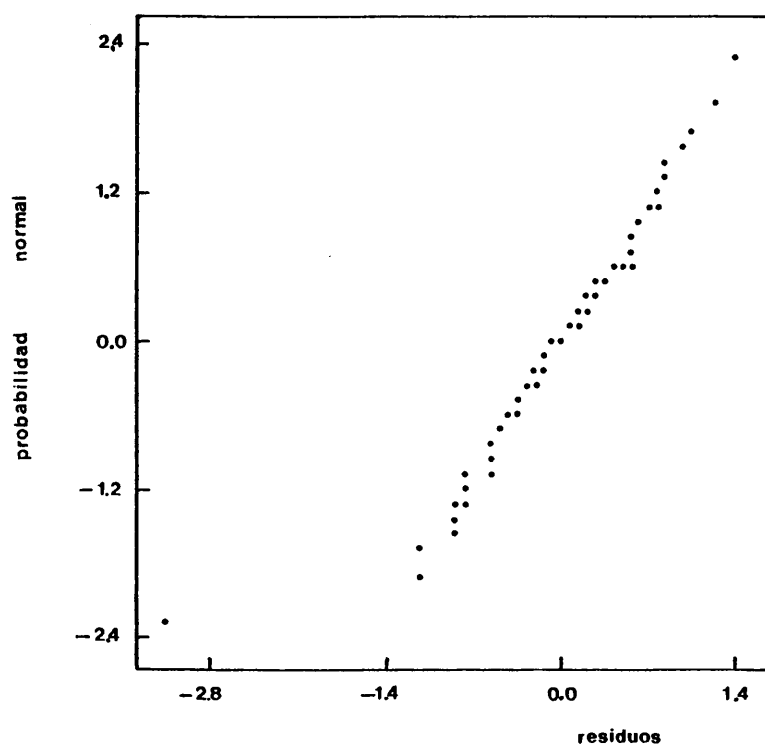


Fig. 59..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 58 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.)

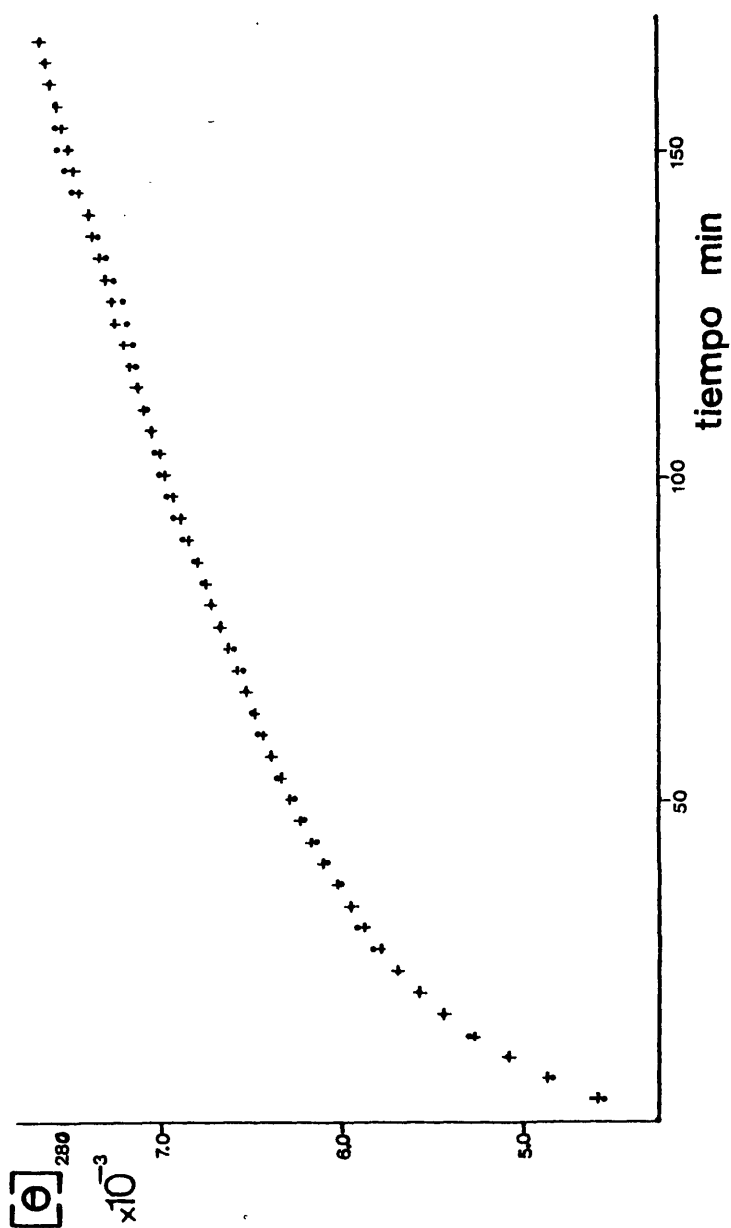


Fig. 60.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión con tripsina de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 40mM a pH = 8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.

• curva experimental
+ curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.)

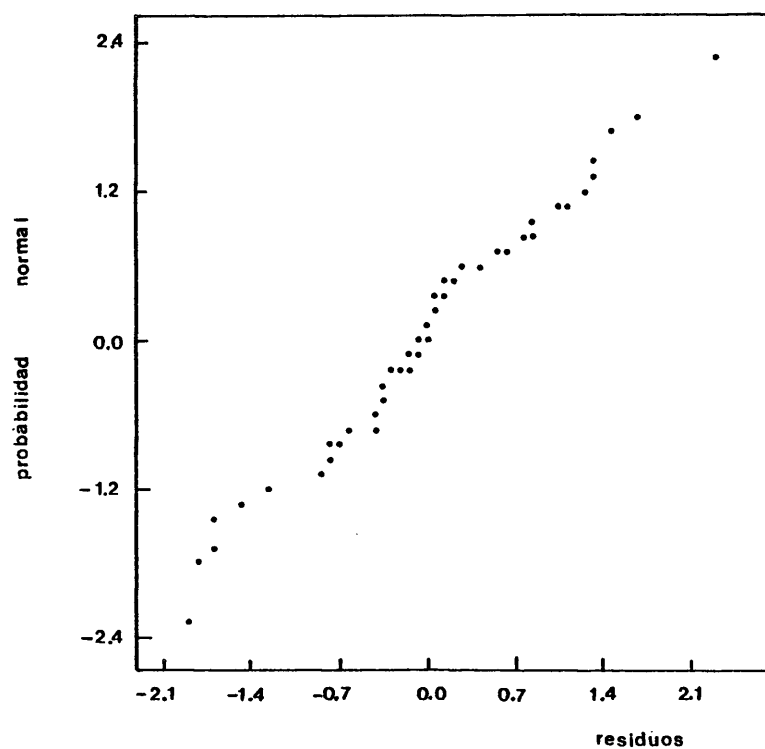


Fig. 61..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 60 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.)

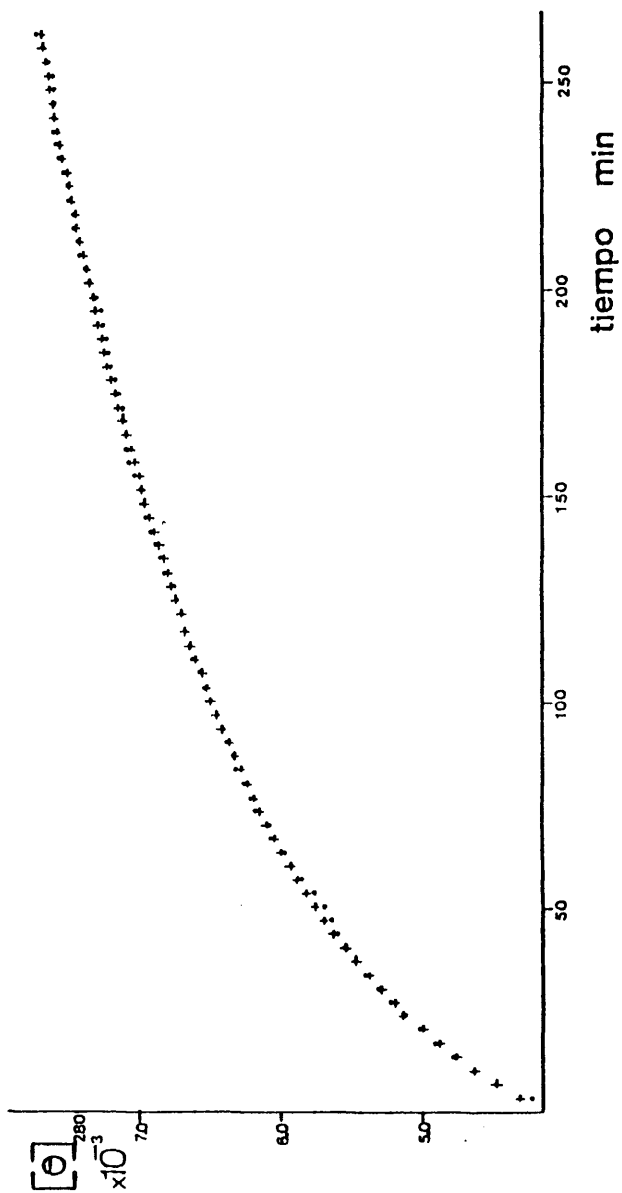


Fig. 62.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión con tripsina de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 60mM a pH = 8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25
 (.) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2)

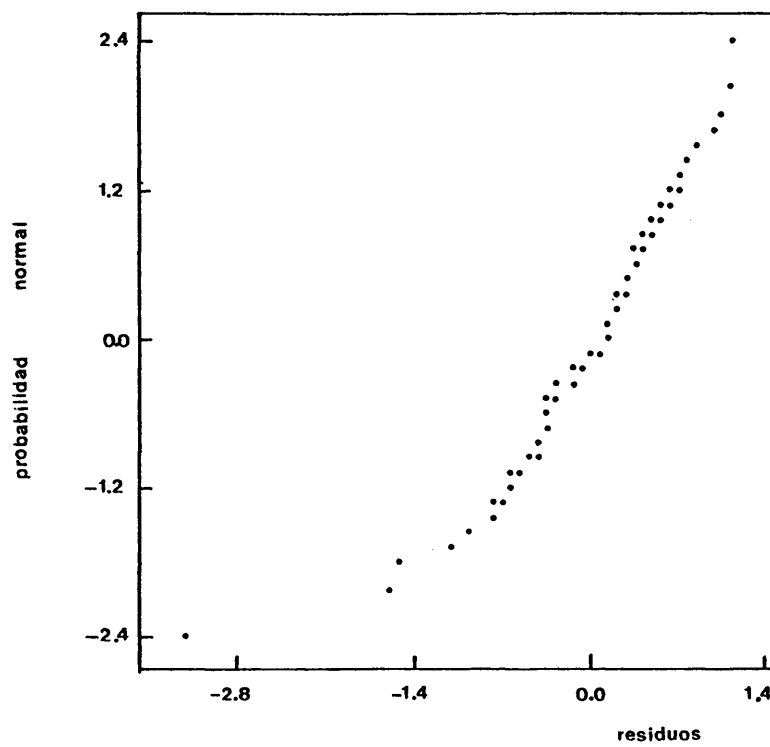


Fig. 63..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 62 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.)

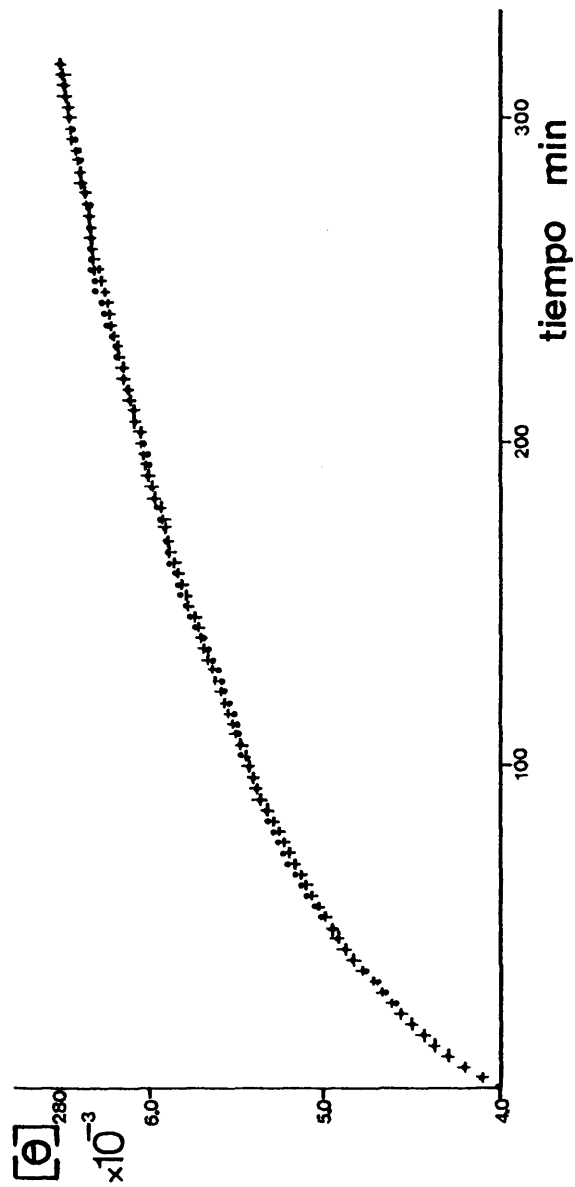


Fig. 64.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión con tripsina de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 100mM a pH = 8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 (•) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.)

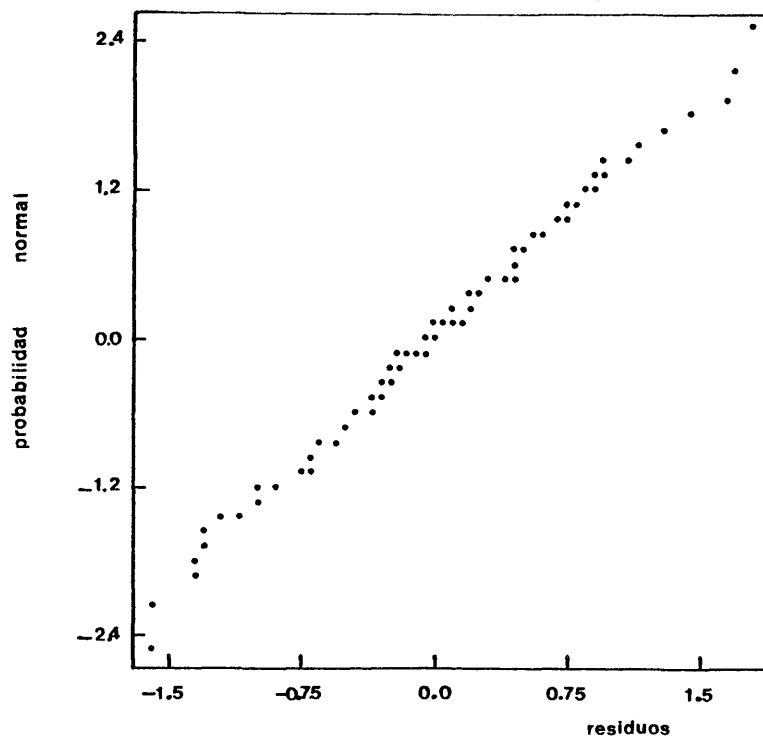


Fig. 65.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 64 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

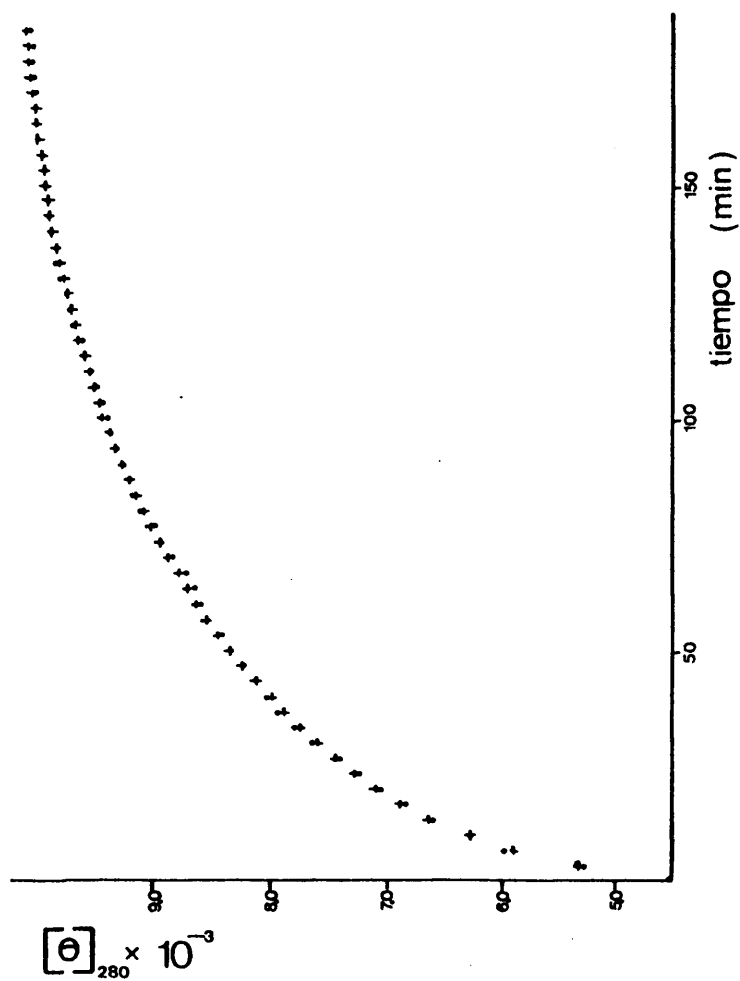


Fig. 66.- Variación de la elipticidad molar en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ a 280 nm con el tiempo en la digestión con tripsina de cromatina en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 20mM a pH=8.0 realizada a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/24.
 (.) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

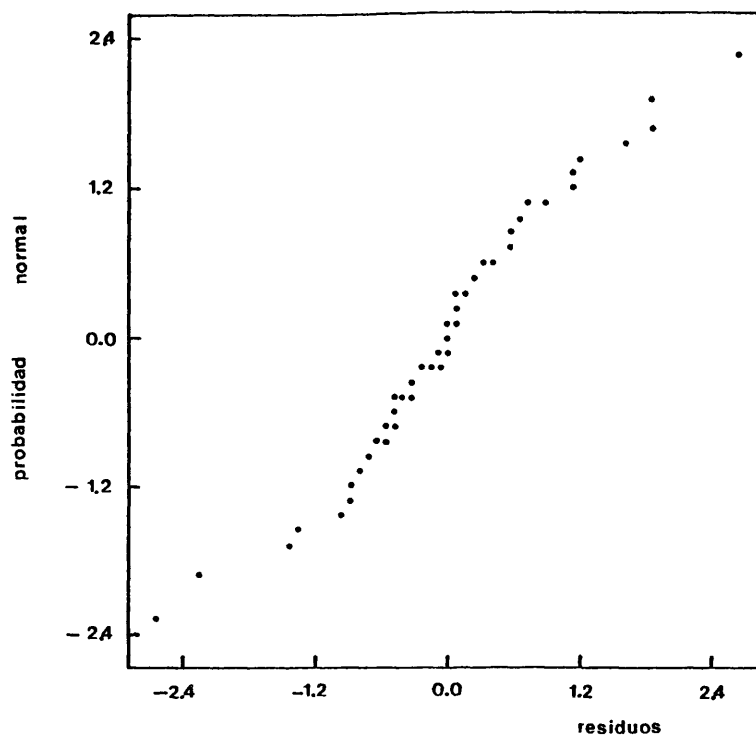


Fig. 67.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 66 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

TABLA IV

Parámetros cinéticos determinados en los experimentos de digestión de cromatina con tripsina seguidos por dicroísmo circular. Las columnas 1, 2 y 3 indican las condiciones de incubación.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I CNA	Tripsina	Temp.	k_1 $\times 10^2$	k_2 $\times 10^2$	θ_1	θ_2	$\theta_1 + \theta_2$	$\Delta\theta$ total exp.	θ final exp.	$(\Delta\theta$ total exp.) - $-(\theta_1 + \theta_2)$	rms
(mM)	(pH)	(°C)	(min ⁻¹)	(min ⁻¹)	(1)	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	(3)
0	1:25	26	3.8	3.1	1519	1918	3427	7285	11.205	3.758	3.44
5	1:25	26	4.4	3.8	1365	2126	3761	6725	11.223	2964	0.80
10	1:25	26	5.7	1.2	1654	2805	4459	6620	11.322	2161	0.95
20	1:25	26	9.4	0.83	1147	4445	5592	7091	11.620	1499	0.43
40	1:25	26	7.8	0.42	1338	4705	6043	7376	11.408	1333	1.09
60	1:25	26	3.7	0.52	940	3450	4390	7437	11.350	3047	0.84
100	1:25	26	3.9	0.40	532	2771	3303	7611	11.300	4308	1.2
0	1:300	26	0.22	—	4476	—	—	—	—	—	2.6
20	1:2,4	26	16	1.5	1428	4205	5633	7091	11.600	1458	0.68

(1) (grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$)

(2) $\Delta\theta$ total exp. = θ final exp. - θ inicial (para el cálculo de esta diferencia se tomó en todos los casos un valor de θ final exp. de 11.600 grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$)

(3) rms se calculó como se indica en el apartado 2.11.5.2.2.

termedias el proceso no es bifásico. La figura 67 ilustra la calidad del ajuste teórico de la figura 66.

3.2.6.2.2.- Digestiones continuas de cromatina desprovista de histonas H1/H5.

Los experimentos de digestiones continuas de cromatina desprovista de histonas H1/H5 se realizaron en las mismas condiciones y en el mismo intervalo de fuerzas iónicas que los ya indicados en cromatina nativa. En este caso no se obtuvo ninguna representación de Θ_{280} frente al tiempo de tipo bifásico, por lo cual se introdujeron todos los puntos experimentales en el programa de cálculo para todas las fuerzas iónicas estudiadas. Los criterios de selección del ajuste teórico más adecuado para cada una de las curvas experimentales fueron los ya indicados en el apartado anterior.

En las figuras 68, 72, 74, 76, 78, 80 y 82 se muestran las curvas experimentales (*) y sus ajustes teóricos a curvas de dos exponenciales (+) de las incubaciones tripticas realizadas en presencia de concentraciones de ClNa 0, 5, 10, 20, 40, 60 y 100 respectivamente. Las figuras 69, 73, 75, 77, 79, 81 y 83 muestran la calidad del ajuste teórico obtenido para cada una de dichas concentraciones salinas. Las constantes cinéticas y ordenadas en el origen respectivas se encuentran reunidas en la tabla V.

La figura 70 muestra la cinética obtenida en una incubación con tripsina de cromatina sin histonas H1/H5 realizada en las mismas condiciones de fuerza iónica que la que ilustra la figura 68 pero empleando una relación enzima/DNA de 1/1000 y una temperatura de incubación de 29°C, los parámetros cinéticos obtenidos se

encuentran en la tabla V. La figura 71 corresponde a la representación de los residuos del ajuste teórico de la figura 70 frente a sus probabilidades normales.

Aunque no se apreciaba bifasicidad en ninguna de las curvas obtenidas, el valor máximo de Θ_{280} alcanzado no supera, en ningún caso, $9-9,500 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$, siendo este valor inferior al $\Theta_{\text{final exp.}}$ (tabla V) registrado después de 48 horas de incubar cada muestra a temperatura ambiente. Por otra parte, la suma $\Theta_1 + \Theta_2$ no se corresponde en todos los casos con el $\Delta\Theta_{\text{total exp.}}$ correspondiente; dichos valores se alejan más entre sí en condiciones de fuerza iónica baja (ClNa 0-5 mM) y alta (ClNa 40-100 mM) (tabla V) de modo análogo al indicado en los experimentos realizados en cromatina nativa discutidos en el apartado anterior.

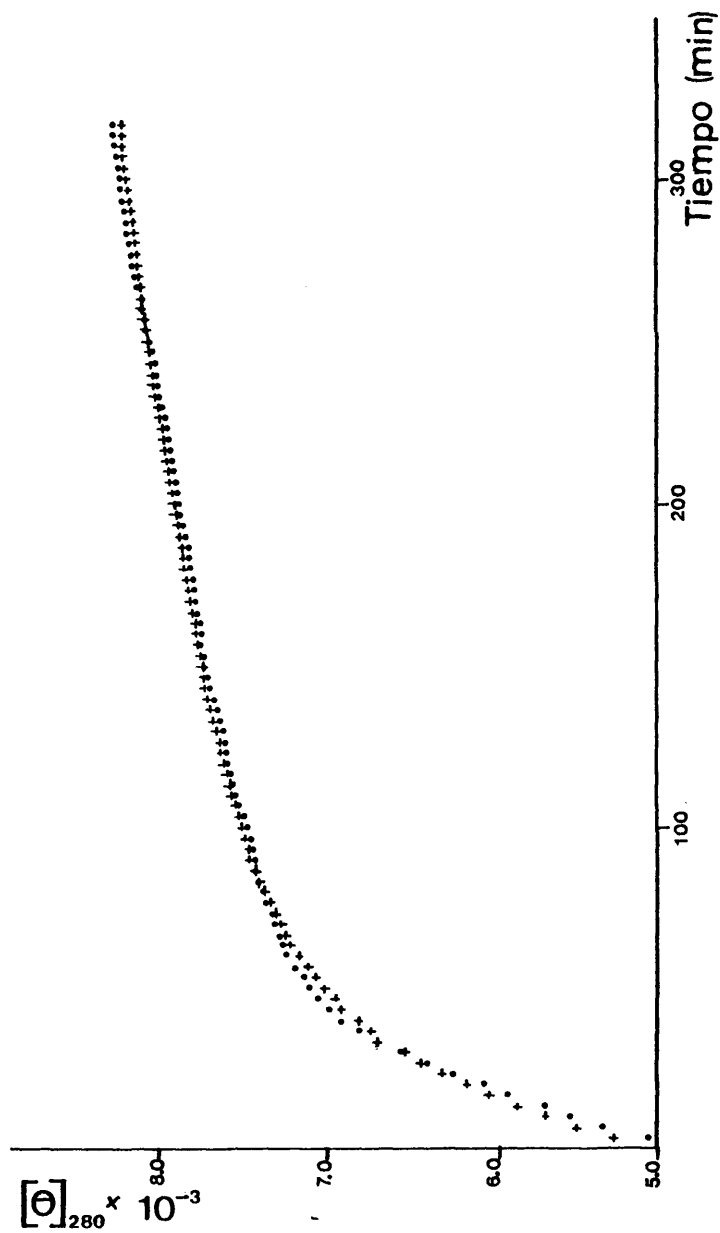


Fig. 68.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA=1/25.
 (•) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

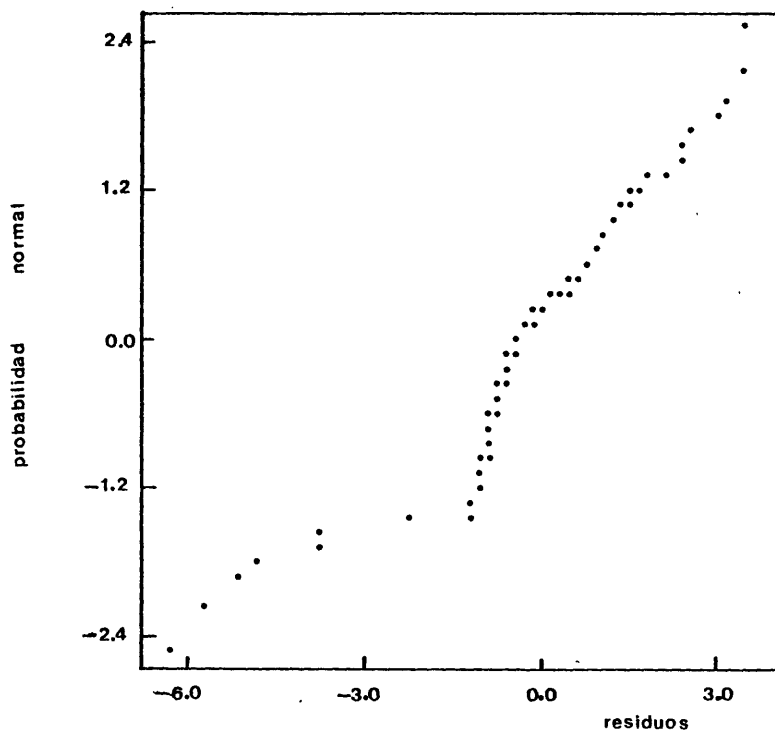


Fig. 69.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 68 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

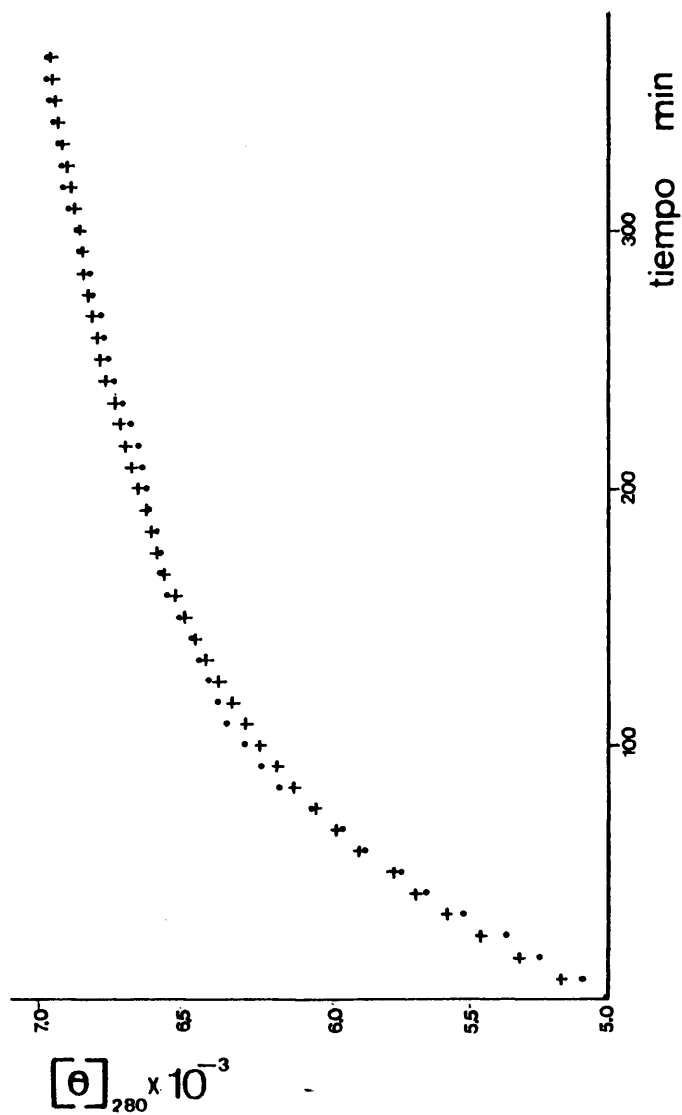


Fig. 70.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados x cm²/dmol durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM y EDTA 1mM a pH=8.0 con tripsina a 29°C; relación tripsina/DNA=1/1000.
 (•) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

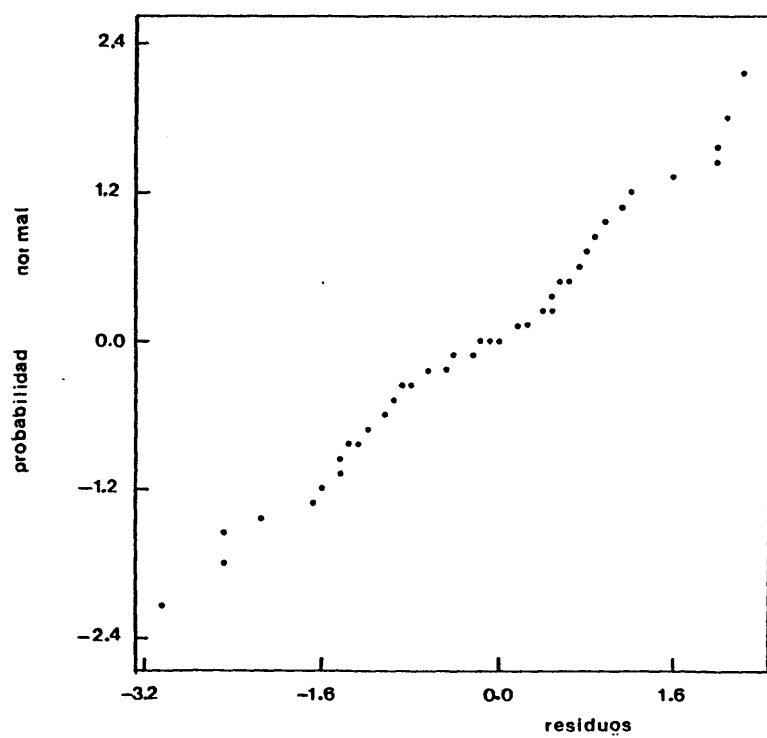


Fig. 71.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 70 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

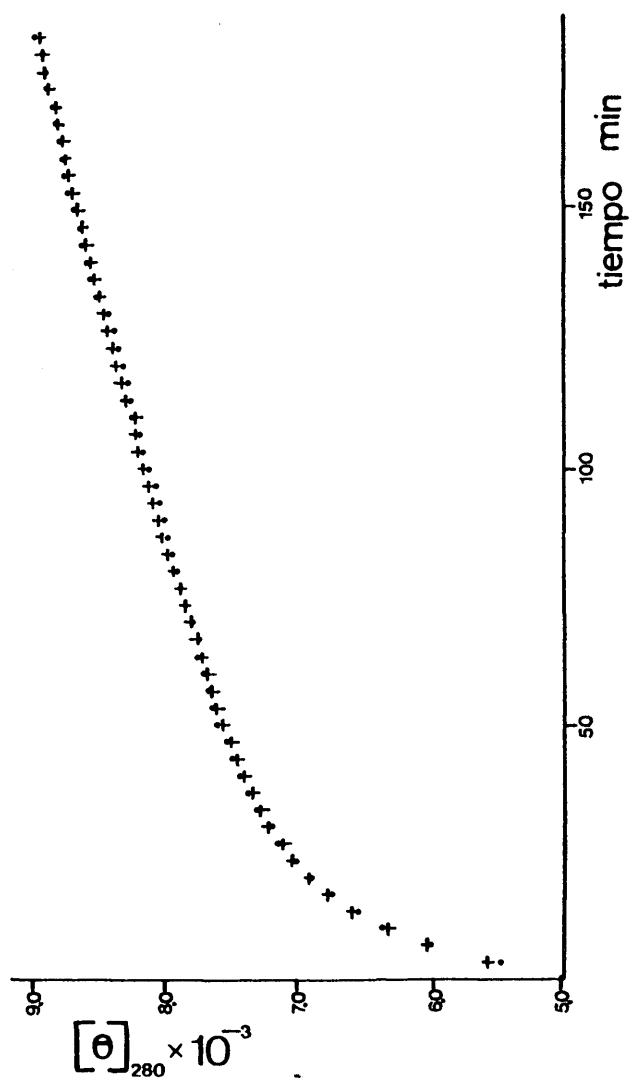


Fig. 72.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM ; EDTA 1mM y ClNa 5mM a pH=8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 (•) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.3.).

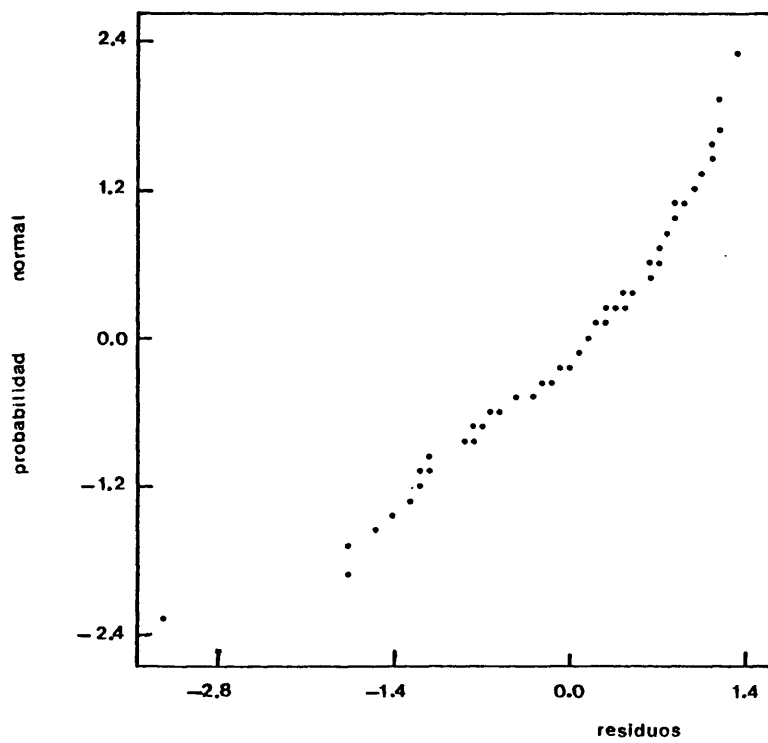


Fig. 73..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 72 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

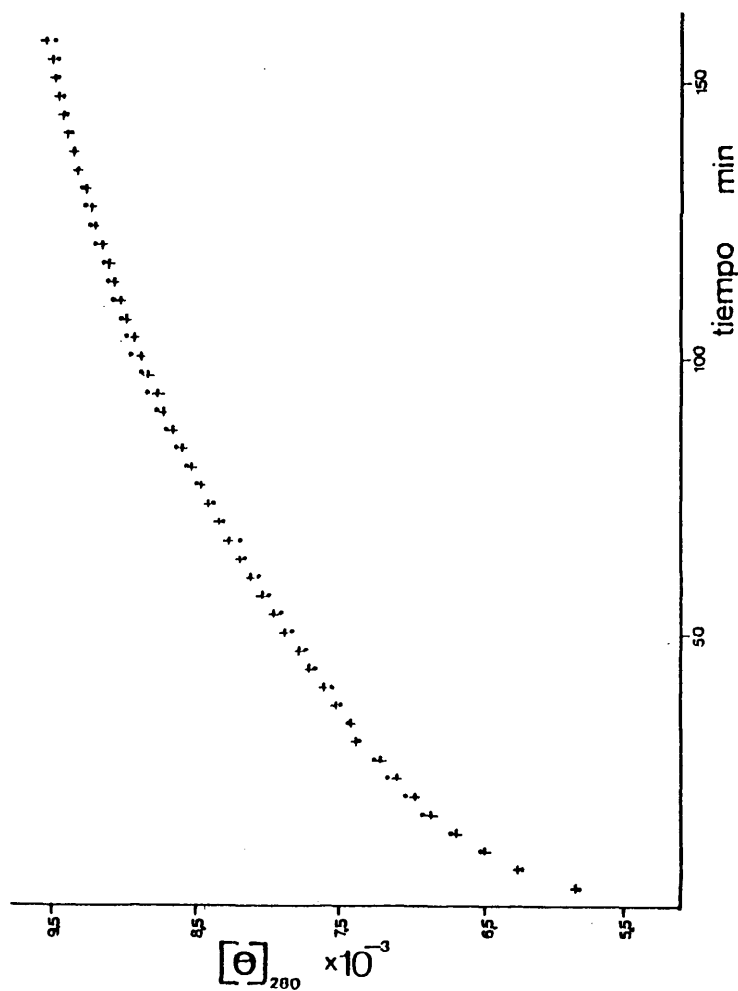


Fig. 74.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados x cm²/dmol durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 10mM a pH = 8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 (.) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

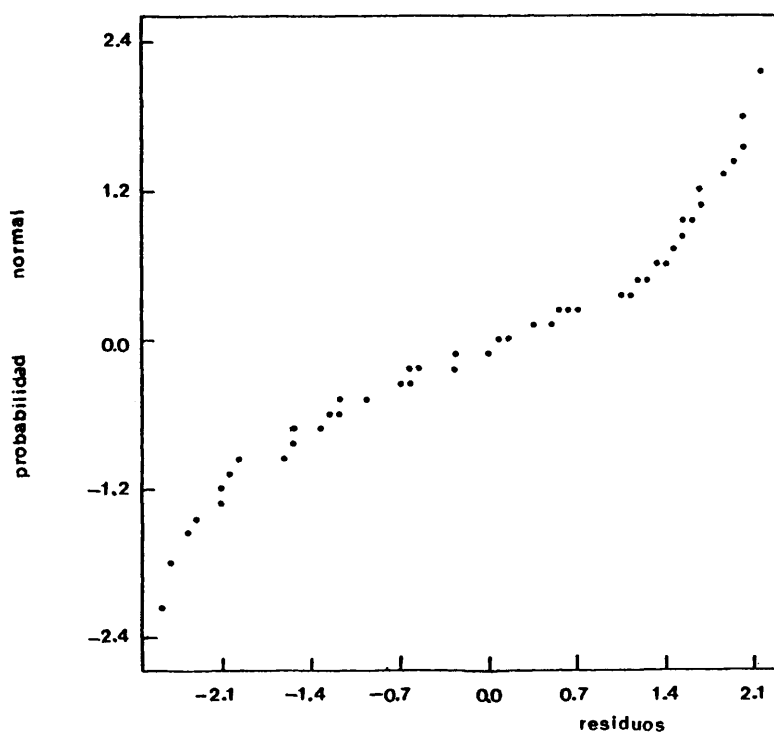


Fig. 75.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 74 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

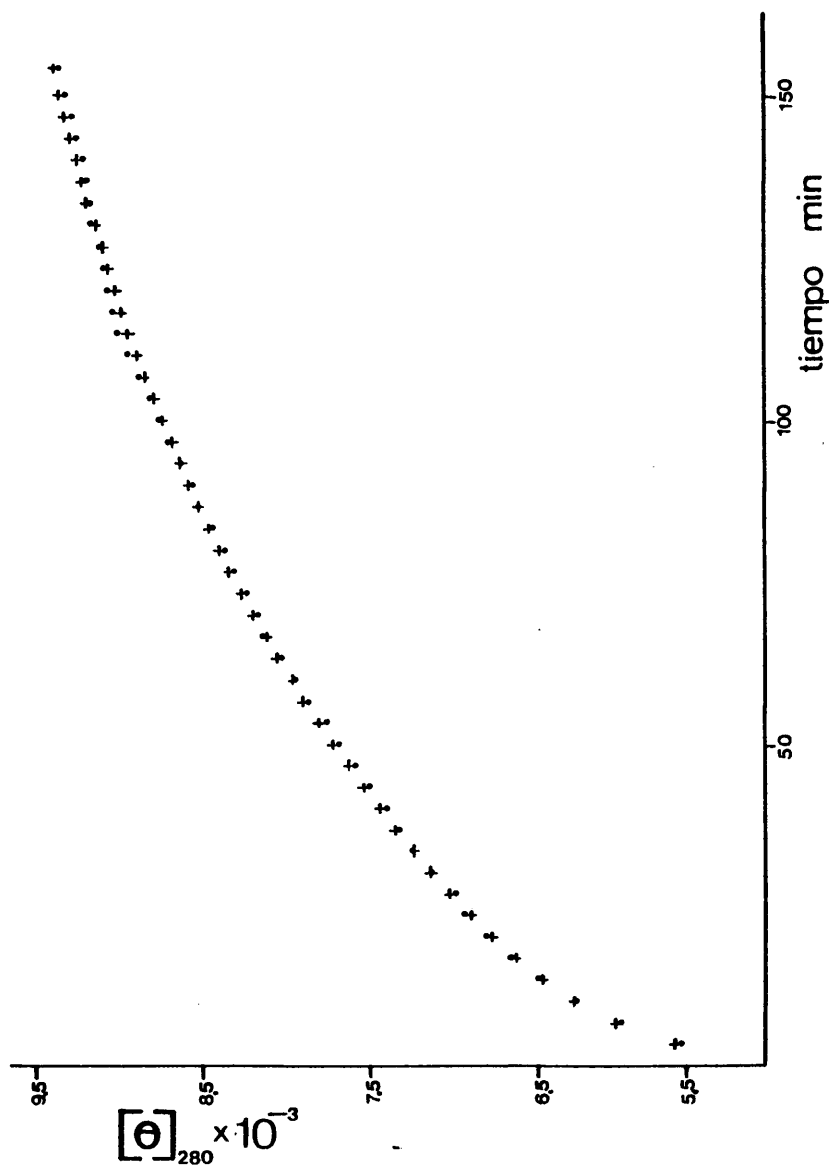


Fig. 76.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 20 mM a pH=8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.

(.) curva experimental

(+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMPP (apartado 2.11.5.2.2.).

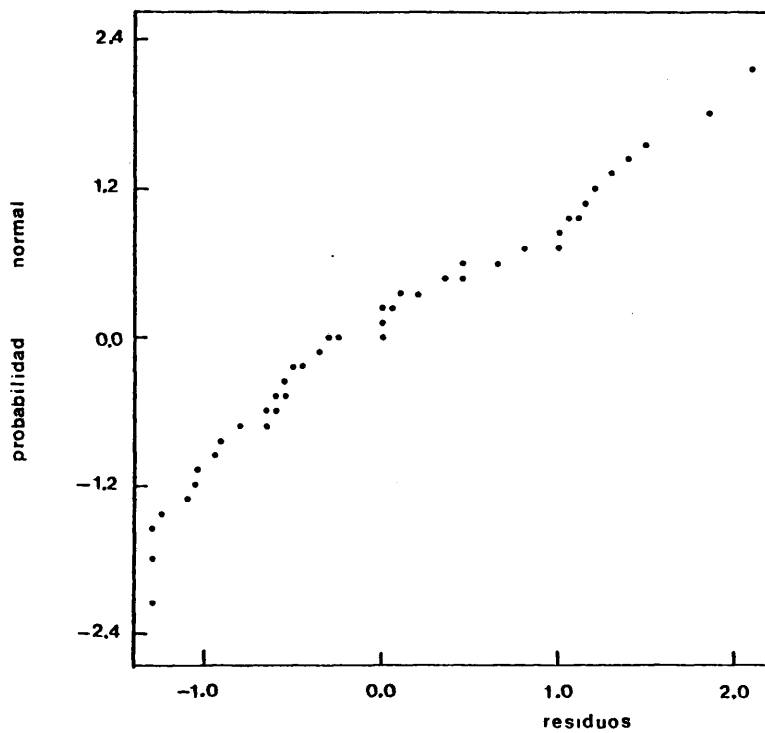


Fig. 77.- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 76 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

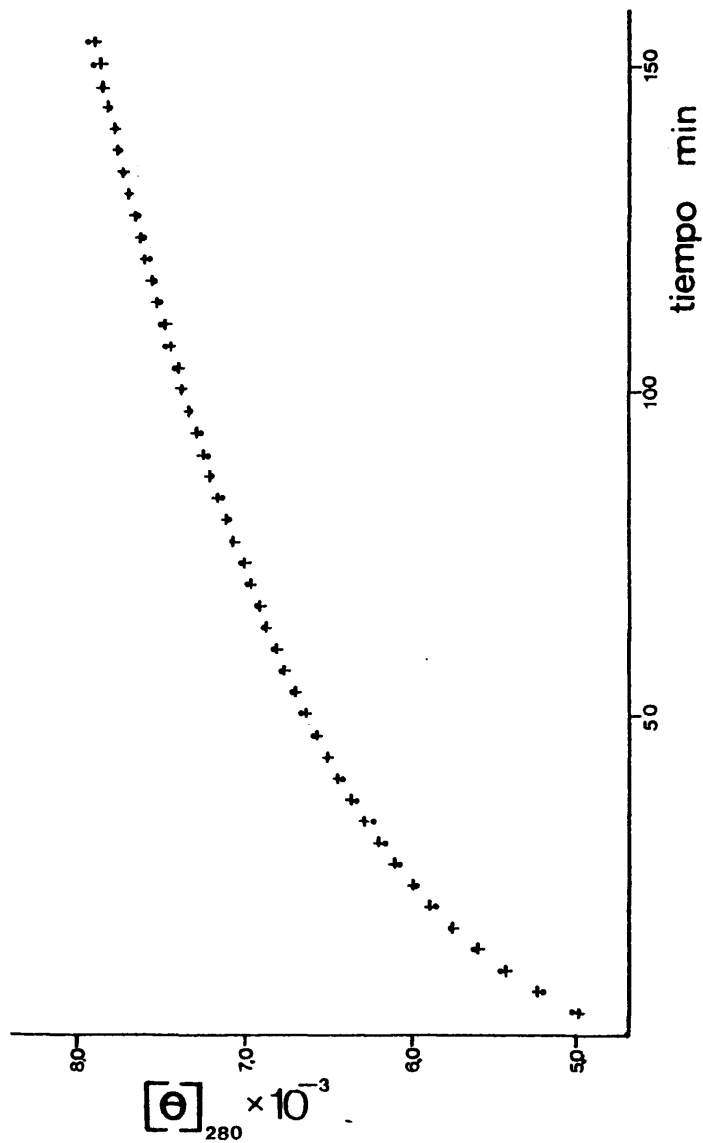


Fig. 78.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 40 mM a pH = 8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 (•) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

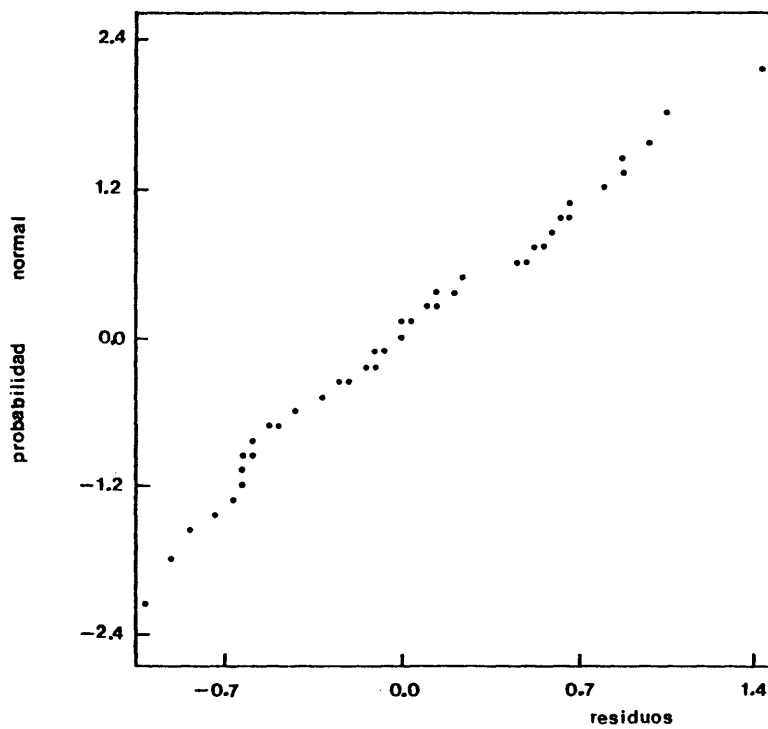


Fig. 79..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 78 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

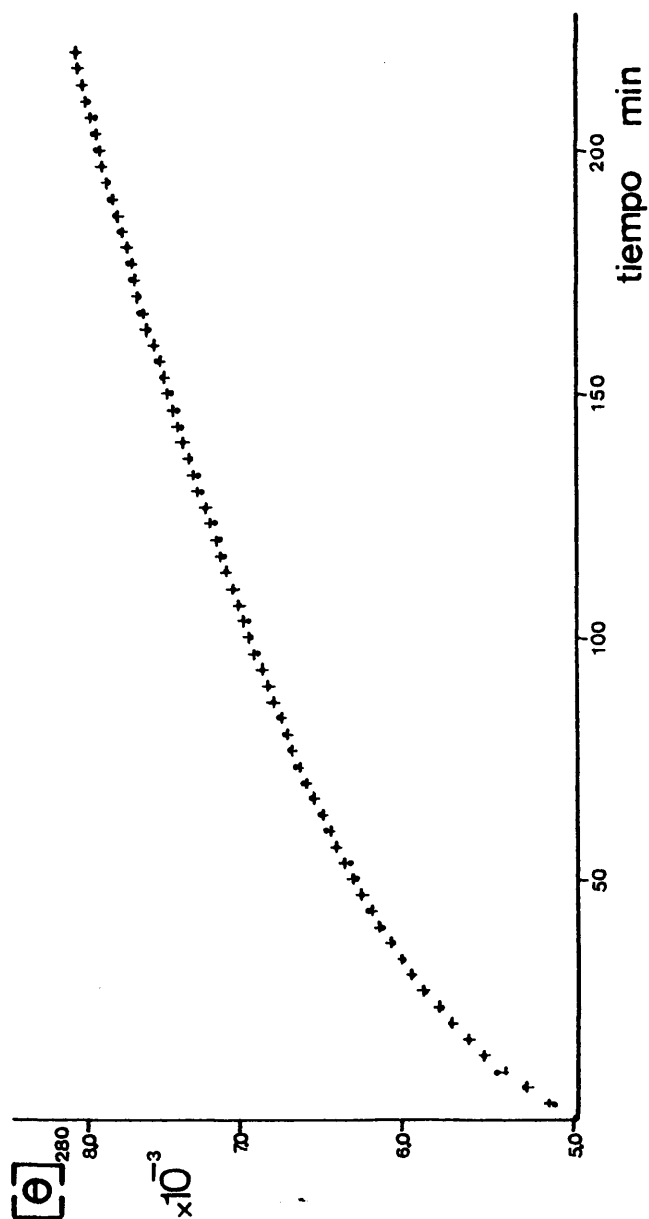


Fig. 80.- Variación con el tiempo de la elipticidad molar a 280 nm en grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$ durante la digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 60 mM a pH=8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 (.) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

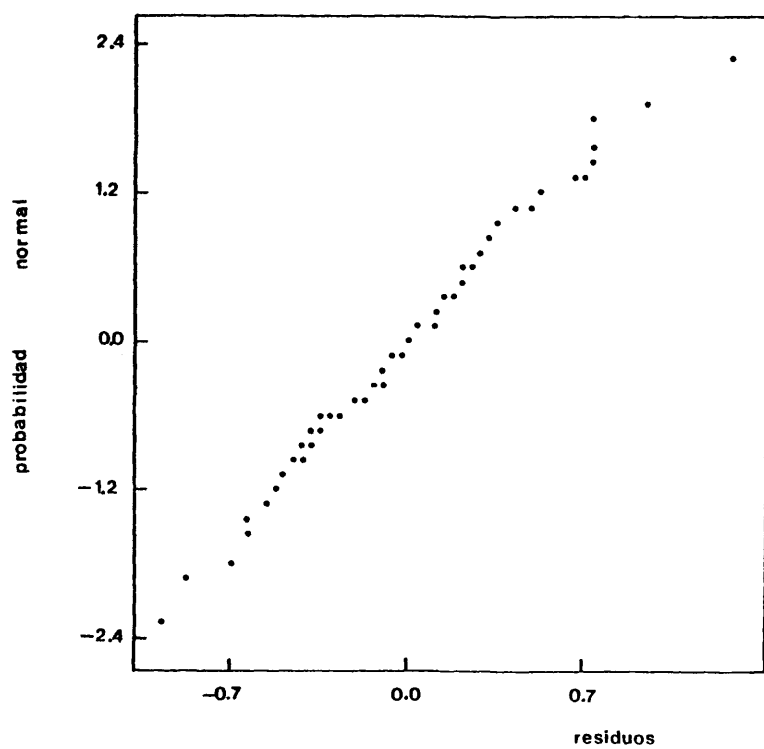


Fig. 81..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 80 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

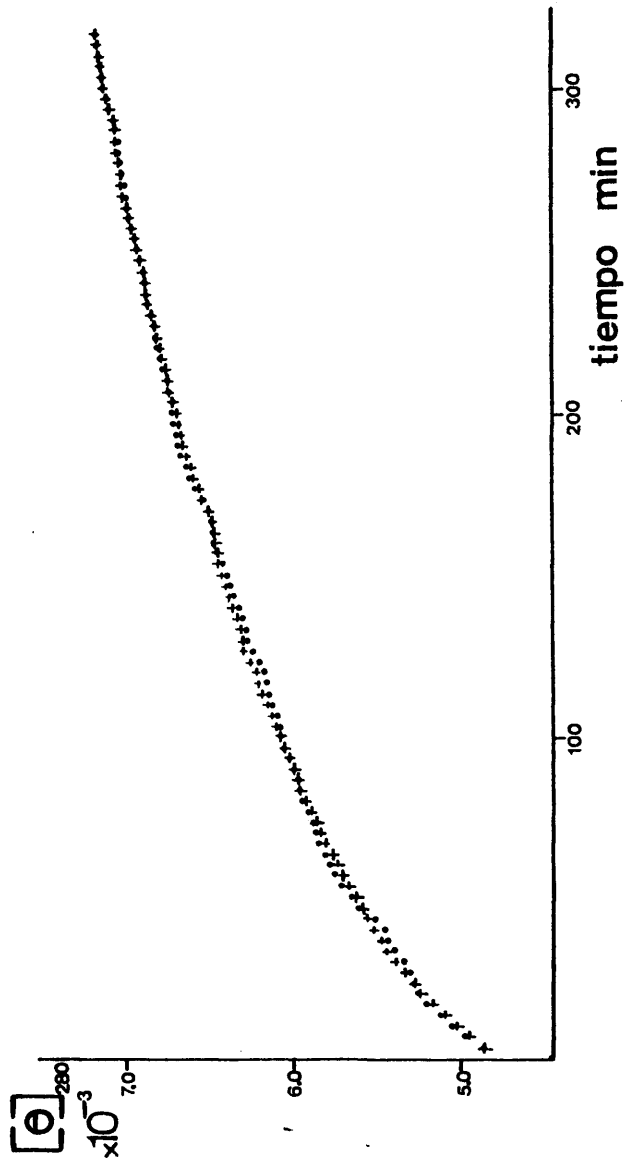


Fig. 10. Variación del tiempo de la digestión de la cromatina desprovista de histonas H1/H5 en tampón Tris-ClH 5mM; EDTA 1mM y ClNa 100mM a pH=8.0 con tripsina a 26°C; relación tripsina/DNA = 1/25.
 (.) curva experimental
 (+) curva teórica obtenida mediante el programa de cálculo BMDP (apartado 2.11.5.2.2.).

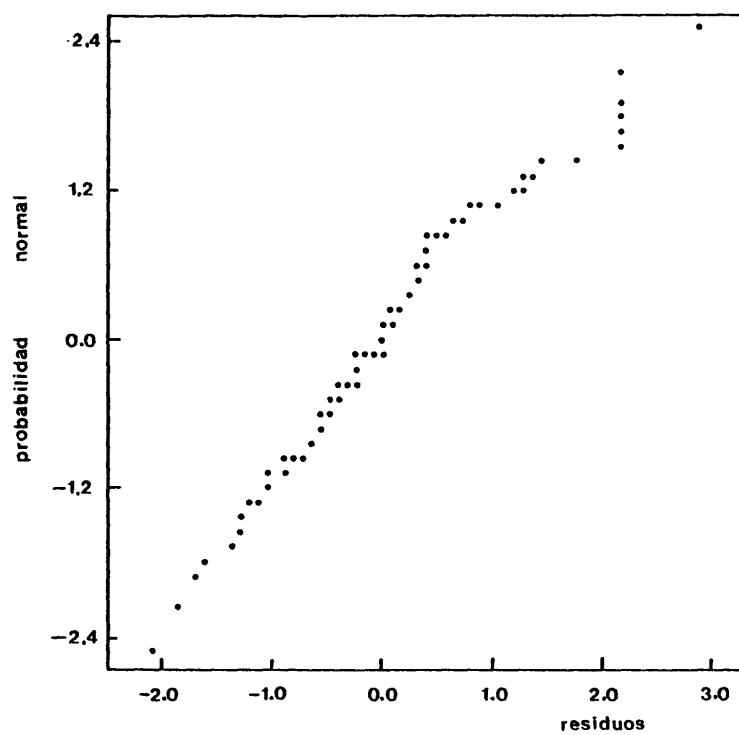


Fig. 83..- Representación de los residuos obtenidos en el ajuste teórico a dos exponenciales de la curva experimental de la figura 82 frente a sus probabilidades normales (apartado 2.11.5.2.2.).

TABLA V

Parámetros cinéticos determinados en los experimentos de digestión de cromatina desprovista de histonas H1/H5 con tripsina seguidos por difracción circular. Las columnas 1, 2 y 3 indican las condiciones de incubación.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	Trips./DNA	Temp.	k_1 $\times 10^2$ (min ⁻¹)	k_2 $\times 10^2$ (min ⁻¹)	θ_1	θ_2	$\theta_1 + \theta_2$	$\Delta\theta$	total exp.	$\theta_{\text{final exp.}}$	$(\Delta\theta_{\text{total exp.}}) -$ $-(\theta_1 + \theta_2)$
CUNA	(p:p)	(°C)	(min ⁻¹)	(min ⁻¹)	(1)	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)
0	1:25	26	3.5	0.22	2105	2160	4265	6583	11.200	2318	2.11
5	1:25	26	9.9	0.32	1916	4663	6579	6604	11.205	25	0.87
10	1:25	26	22	0.97	1151	4212	5363	6505	11.487	1142	1.43
20	1:25	26	18	1.00	874	4252	5126	6473	11.689	1347	0.90
40	1:25	26	7.6	0.72	951	3367	4318	6924	11.608	2606	0.80
60	1:25	26	5.2	0.32	748	4489	5237	6634	11.608	1397	0.68
100	1:25	26	4.8	0.37	410	2880	3290	7151	11.600	3861	1.2
0	1:1000	29	0.16	0.01	1881	1881	3762	6583	11.620	2821	2.57

(1) (grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$)

(2) $\Delta\theta_{\text{total exp.}} = \theta_{\text{final exp.}} - \theta_{\text{inicial}}$ (para el cálculo de esta diferencia se tomó en todos los casos un valor de $\theta_{\text{final exp.}}$ de 11.600 grados $\times \text{cm}^2/\text{dmol}$)

(3) rms se calculó como se indica en el apartado 2.11.5.2.2.

3.3.- Discusión general

Gran parte de los resultados expuestos en ésta memoria se ha discutido en su momento. Esto ha sido posible con aquellos aspectos de la investigación realizada cuyo significado e interpretación era patente con los datos particulares obtenidos en cada experimento. Sin embargo, como quiera que una correcta interpretación de algunos resultados exige una consideración de conjunto de dos o más aspectos de la investigación realizada, se discuten en este apartado algunos aspectos del trabajo llevado a cabo que permiten la integración y exposición conjunta de los mismos.

En primer lugar, es necesario considerar los efectos de la digestión triptica sobre el tamaño del nucleosoma. La figura 18 pone de manifiesto que la cromatina, tras una prolongada digestión con tripsina, no da muestras de degradación nucleásica, ya que su electroforésis revela la presencia exclusiva de bandas de baja movilidad correspondientes a fragmentos de DNA de tamaño aparentemente semejante a los presentes en la cromatina nativa. Este hecho es importante porque pone de manifiesto que la nucleasa utilizada para la obtención de cromatina soluble, que sigue estando presente en la muestra digerida, no se ha reactivado durante la incubación con tripsina. La presencia de EDTA a lo largo de todo el proceso es seguramente, la causa de que la nucleasa no se reactive y, en cualquier caso, estos resultados permiten descartar que los efectos de la digestión triptica se vean afectados por artefactos que tendrían lugar caso de una actuación simultánea de nucleasa.

En la figura 18, b y c se observa que, tras digestión prolongada con tripsina, la cromatina sigue manteniendo en cierto modo

la organización nucleosomal. Los resultados sugieren que el límite de digestión con nucleasa de esta cromatina es de 105 p.b. si bien se manifiestan pausas en la digestión al alcanzarse tamaños de aproximadamente 166, 140 y 117 p.b. En cualquier caso, la cromatina digerida con tripsina es menos estable a la digestión con nucleasa que la cromatina nativa, como se ha reseñado en el apartado 3.2.4., pero esto es lógico si se tiene en cuenta (figura 33, j) que tras 120 h de hidrólisis triptica no queda ninguna histona intacta en la cromatina.

A partir de las constantes cinéticas correspondientes al aumento de elipticidad en estas condiciones, cuya determinación se ha indicado en el apartado 3.2.6.1., se puede calcular el progreso de los dos procesos correspondientes a la primera fase de incremento de dicroismo en la digestión triptica. Puesto que el progreso de dichos procesos exponenciales es $1 - e^{-kt}$, se puede calcular fácilmente que, al cabo de 120 h, el primer proceso ha avanzado el 98% de un incremento final (Θ_1), mientras que el segundo sólo ha avanzado un 22%.

Los resultados de estos cálculos junto con los realizados para todos los tiempos indicados en la figura 33, se recogen en la tabla VI.

En la figura 33,j, puede observarse que, a las 120 h de comenzada la hidrólisis triptica, cuando ya se ha completado virtualmente la primera fase de aumento de dicroismo, está presente en la cromatina el péptido P3 (vease el apartado 3.2.2. para la nomenclatura de los péptidos) que, posiblemente corresponda a la zona globular de la histona H1, como parece indicar la figura 32.

TABLA VI

Progreso temporal de los dos procesos de incremento de θ_{280} correspondientes a la fase observable en la digestión triptica de cromatina nativa.

t (horas)	% del estado final	
	Proceso 1	Proceso 2
0	0	0
3	9	0.6
6	18	1
22	52	4
29	62	6
46	78	9
54	83	10
69	90	13
94	95	17
120	98	22
168	99	29

Los porcentajes indicados se han calculado como $(1-e^{-kt}) \times 100$ utilizando las constantes k_1 y k_2 calculadas en el apartado 3.2.6.1. Las condiciones de digestión fueron: $T=4^{\circ}\text{C}$; Tripsina/DNA=1:600.

En segundo lugar se encuentra un péptido con movilidad semejante a la histona H4, que posiblemente corresponda con el identificado por Böhm y col. (1980) como el fragmento 12-118 de la histona H2A, aunque, como se ha comentado anteriormente, podría ser también un producto de la ulterior digestión del péptido P4, procedente de la histona H3. Finalmente se aprecian unos péptidos mal resueltos con movilidad superior a la de la histona H4, que deben corresponder a los fragmentos 18-102 y 20-102 de la histona H4, identificados por Böhm y col. (1981).

Dos conclusiones se pueden obtener de la discusión precedente. En primer lugar, parece lógico asociar el primer proceso de la primera fase de incremento de diámetro con la digestión de las histonas hasta originar la zona globular de la histona H1, las zonas 18-102 y 20-102 de la histona H4 y la digestión de las demás histonas hasta fragmentos correspondientes a sus zonas globulares, aunque éste último aspecto de la conclusión no pueda afirmarse a la vista de la figura 33.

En segundo lugar, hay que destacar el hecho de que, cuando el primer proceso ha terminado prácticamente y el segundo - que debe estar relacionado con la ulterior digestión de las zonas globulares según se discutirá más adelante - sólo ha alcanzado el 22% de su estado final, el límite de digestión con nucleasa es de aproximadamente 105 p.b.. Teniendo en cuenta el tamaño de DNA asociado al core nucleosomal, esto significa que, como consecuencia de la digestión con tripsina, se hacen accesibles a la nucleasa 40 p.b. Si se considera la distribución simétrica de las histonas a lo largo del DNA, parece lógico pensar que estos 40 p.b.

corresponden a 20 a cada extremo del core nucleosomal. Esto puede justificarse como una disminución en la protección de las regiones 120-140 del core nucleosomal. No es necesario considerar la región 0-20 enfrentada a la anterior en la cadena complementaria del DNA pues como muestra la figura 2 dicha región no interacciona con histonas. Esta figura revela también que la región 120-140 quedaría desprotegida como consecuencia de la digestión de H3 y H2A. Más concretamente, la histona H3 interacciona con las 10 bases 3' terminales del DNA nucleosomal pero esta interacción debe establecerse a través del extremo N-terminal de la histona, ya que las zonas globulares de las dos moléculas de H3 del core nucleosomal están situadas en la parte central del nucleosoma (Klug y col., 1980).

Puesto que uno de los dos lugares primarios de digestión con tripsina en la histona H3 de eritrocitos es el enlace peptídico entre Arg²⁶ y Lys²⁷, situado en las proximidades del comienzo de la zona globular, la hidrólisis de dicho enlace facilitaría el acceso de la nucleasa a las 10 bases 3' terminales del DNA. Esto justifica la aparición (figura 18) del fragmento de aproximadamente 117 p.b., de resistencia media a la nucleasa. Para explicar que el límite de digestión se sitúe en aproximadamente 105 p.b. hay que admitir la desprotección adicional de 10 bases (región 120-130) en el extremo 3' terminal. Esto implica la hidrólisis de H2A. La figura 84 muestra la distribución de las zonas globulares y regiones terminales de las histonas a lo largo del DNA nucleosomal según Zinke (1980).

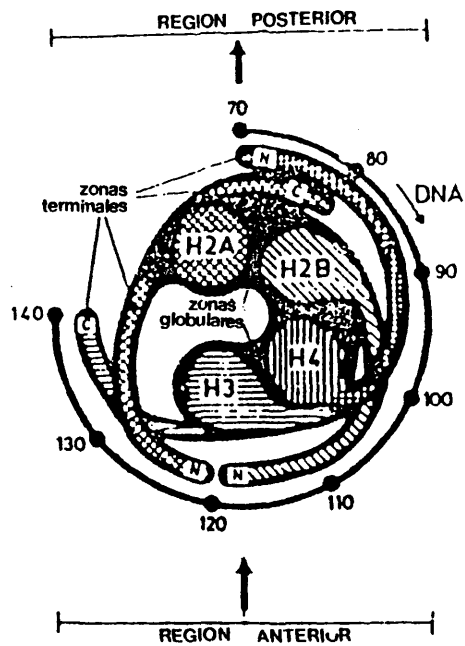


Fig. 84. - Esquema de la ordenación de las regiones terminales y globulares de las histonas y del DNA en una de las dos mitades simétricas del core nucleosomal. (Zinke, M., 1980).

En ella resulta patente que la separación de las zonas globulares y regiones terminales de las histonas conduciría, exclusivamente, a la desprotección de 20 p.b. a cada extremo del nucleosoma, ya que los aproximadamente 105 p.b. restantes siguen estabilizados gracias a las interacciones histona-histona e histona-DNA (con ambas cadenas de la doble hélice).

La discusión precedente justifica que, en una cromatina digerida hasta completar el primer proceso, es decir, hasta separar totalmente las zonas globulares de las histonas de sus regiones N-terminales, el límite de digestión con nucleasa sea de alrededor de 105 p.b. y que se produzca una pausa a, aproximadamente, 117 p.b. Pero en este momento cabe preguntarse por qué siguen presentándose pausas en la digestión a alrededor de 166 y 140 p.b. (Figura 18). La aparición de un fragmento parcialmente resistente de aproximadamente 166 p.b. - que se ha identificado previamente (3.2.4.) como equivalente al cromatosoma - cuando la histona H1 ha quedado reducida a su zona globular, implica una cierta protección a 10 p.b. adicionales a cada extremo del core nucleosomal. Esta conclusión es compatible con la localización que se atribuye a la zona globular de la histona H1 y con los resultados obtenidos por Allan y col. (1980) ya mencionados en el apartado 1.2.2., párrafo 82.

Finalmente, la aparición de un fragmento parcialmente resistente con tamaño semejante al del core nucleosomal puede justificarse si se tiene en cuenta que los restos de la región N-terminal de H3, aún separados de su zona globular por proteólisis pueden seguir interaccionando con el DNA de la región 130-140.

En este momento se pueden discutir ya los experimentos de digestión con DNasa I recogidos en el apartado 3.2.3. Como se ha indicado en él, la variación más importante en los productos de digestión con DNasa I se dan tras las primeras 3 h de incubación con tripsina (figura 35).

En los geles correspondientes a 4,5 h. y 6,5 h de incubación con tripsina ya no se aprecian bandas resistentes a DNasa I de tamaño superior a las 40 bases. La figura 34 muestra que este tiempo corresponde precisamente al de conversión de las histonas en sus zonas globulares, con la excepción de la histona H1, de la que aún queda una cantidad sustancial de los productos intermedios de digestión P1 y P2. La comparación de las figuras 33 y 34 junto con los cálculos indicados en la tabla VI indica que después de 6,5 h de digestión con tripsina en las condiciones experimentales indicadas en la figura 34, el primer proceso de elevación de dicroísmo circular habría alcanzado un 60-80% de su estado final. No pueden hacerse cálculos exactos por cuanto no se determinaron las constantes cinéticas en los experimentos de digestión a 13°C dado el número relativamente bajo de puntos experimentales. No obstante, se puede hacer una estimación aproximada a partir del valor de $k_1 = 5,5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ determinado a 4°C y relación tripsina/DNA de 1/600 (3.2.6.1.), teniendo en cuenta la influencia de la temperatura en la actividad de la tripsina (vease 3.2.1.2.). Como consecuencia de esta estimación se obtiene un valor de $k_1 \approx 3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para la digestión a 13°C y relación tripsina/DNA de 1:300 que, introducido en la correspondiente ecuación (vease tabla VI), da como resultado un progreso del primer proce

so de aproximadamente un 70%, compatible con la estimación anterior.

En cualquier caso, al cabo de 6,5 h de digestión con tripsina (13°, relación 1:300) puede admitirse que el primer proceso, aunque no finalizado, se encuentra ya bastante avanzado. A la vista de las consideraciones anteriores, esto significa que los extremos del core nucleosomal (20 p.b. a cada lado) están parcialmente desprotegidos.

Lutter (1979) ha determinado las constantes cinéticas de digestión con DNasa I en los 13 sitios susceptibles, espaciados de 10 en 10 bases del DNA del core nucleosomal. Según los valores de accesibilidad a la DNasa I; estas constantes varían en el orden

$$(10) \approx (50) > (130) >> (40) >> (20) >> (120) >> (100) > (90) \approx (70) >> (60) > (30) >> (80) \approx (13)$$

En primera aproximación, este orden de susceptibilidad puede tomarse como válido para el core nucleosomal de eritrocitos de pollo, ya que, aunque las investigaciones de Lutter se llevaron a cabo con nucleosomas de hígado de rata, la estructura del core nucleosomal es bastante conservativa.

Admitiendo, pues, la validez de la serie expuesta, y teniendo en cuenta que la desprotección de las regiones 0-20 y 120-140 incrementaría mucho la rotura con DNasa I en las posiciones 10, 20, 120 y 130, los sitios preferentes de hidrólisis con DNasa I en la cromatina digerida con tripsina serán las posiciones 50 y 40; en principio, si la accesibilidad a la DNasa I en las posiciones internas no se modificara tras la digestión con tripsina, to

dos los demás sitios potenciales serían muy poco susceptibles a la DNasa I en comparación con los dos indicados. No parece ser éste el caso, ya que no se obtiene (figura 35) el fragmento de 70 bases (50-120) que sería de esperar a la vista del razonamiento precedente y se obtiene uno de 30 bases y otro de 40 cuya procedencia no tiene justificación. Hay que admitir, pues, que, como consecuencia de la digestión con tripsina varía la susceptibilidad de algún sitio a la hidrólisis con DNasa I. Este sitio podría ser la posición 90. En efecto admitiendo esta hipótesis se puede justificar la procedencia de los tres fragmentos observados. El fragmento de 20 bases sería mayoritariamente el 20-40; el de 30 bases podría proceder de la región 90-120 y el de 40 correspondería a la zona 50-90. Hay que advertir, sin embargo, que el hecho de que no se obtengan fragmentos mayores no sólo exige el incremento específico de suceptibilidad en la posición 90, sino también exige un incremento generalizado en la digestibilidad con DNasa I.

Las posibles causas de este incremento generalizado en accesibilidad se discutirán mas adelante. Ahora puede mencionarse que la histona H3 protege la posición 90 (Shick y col., 1980), lo que significa que el incremento específico en la accesibilidad de la DNasa I, puede relacionarse con el hecho de que ésta histona es la que mas rápidamente se degrada por la tripsina, excepción hecha de las muy ricas en lisina.

Para terminar la discusión es preciso aumentar los resultados obtenidos al determinar el aumento de la elipticidad a 280 nm en el transcurso de la digestión triptica.

Los experimentos descritos en el apartado 3.2.6.1. ponen de manifiesto que al digerir cromatina con tripsina en condiciones muy suaves ($T=4^{\circ}\text{C}$; relación tripsina/DNA = 1:1000) se aprecia una disminución en el dicroismo en los primeros instantes de la reacción. Este efecto debe atribuirse a la presencia de las histonas H1/H5, ya que no se observa en cromatinas desprovistas de ellas.

Como ya se ha indicado en el apartado 3.2.6.1, el dicroismo alcanza el valor inicial a las 8 h de digestión y a partir de entonces aumenta normalmente. Para interpretar éste fenómeno a nivel de la estructura de la cromatina habrá, pues, que tener en cuenta los cambios que se aprecian en las histonas en el periodo 0-8 h de incubación. La figura 31 revela que, en este período, desaparece la histona H1 para dar lugar a unos péptidos de alto peso molecular precursores del péptido P1. Este, a su vez, ya es visible a las 8 h de digestión, tiempo en el que, incluso, puede apreciarse una pequeña proporción de P2. Es sorprendente que la escisión de una pequeña región de los extremos N- ó C-terminales de la histona H1 produzca tal efecto, pero dado el tamaño del péptido P1 es obvio que la digestión de la histona H1 se comienza a producir en alguna región o regiones muy próximas a sus extremos. Es evidente que los datos obtenidos no permiten decidir sobre la causa exacta de la disminución de dicroismo, pero hay que destacar que recientemente (Barbero, J.L., Montero, F. y Franco, L. manuscrito en preparación) se ha demostrado que la digestión trípica de las regiones N- y C-terminales de la histona H1 conducen a un cambio estructural de su zona globular hacia una conformación mas relajada. Si esto ocurre también en la cromatina el cambio

conformacional de la zona globular de H1 que interacciona probablemente con la región 70 del core nucleosomal y con el DNA situado a ambos extremos podría a su vez inducir un cambio en el DNA nucleosomal que se tradujera en la disminución de θ_{280} .

Los experimentos recogidos en el apartado 3.2.6.2. exigen un comentario más detallado. Está claro que el incremento de dicroismo es consecuencia de la pérdida de estructura terciaria del DNA en la cromatina para ir adquiriendo la característica estructura B del DNA en disolución.

Como se ha indicado en 3.2.6.2.1. el incremento de dicroismo transcurre en dos fases, aunque la segunda no es siempre observable y comienza una vez completada la primera. En cierto modo puede hablarse de cooperatividad en el aumento de dicroismo, de forma que es absolutamente necesario que se dé la primera fase para que pueda tener lugar la segunda. Es evidente que la pérdida de estructura que se da en la segunda fase supone la previa destrucción que ocurre en la primera, lo que implica que los enlaces peptídicos cuya hidrólisis es responsable de la segunda fase sólo se hacen accesibles a la hidrólisis trípica cuando se ha completado la hidrólisis de los enlaces responsables de la primera fase de incremento de θ_{280} .

La primera fase - la única que se ha estudiado - está formada por dos procesos que comienzan desde el principio de la digestión trípica, aunque sus parámetros cinéticos sean diferentes.

Las constantes cinéticas de pseudo-primer orden determinadas corresponden, estrictamente hablando, a la pérdida de estructura terciaria del DNA de la cromatina como consecuencia de la digestión

ti3n triptica de las histonas. Estas constantes deben guardar alguna relaci3n con las correspondientes a la hidr3lisis de los enlaces peptidicos pero a priori no tienen por qu3 ser iguales. En efecto, la rotura de algunos enlaces peptidicos - como lo que conduzcan a la separaci3n de las zonas globulares y las regiones N-terminales de las histonas - puede conducir a una elevaci3n relativamente grande del dicroismo, mientras que la hidr3lisis de otros enlaces puede tener poca o ninguna influencia sobre la elevaci3n del dicroismo.

La comparaci3n de los resultados recogidos en los apartados 3.2.5. y 3.2.6. muestra que tal suposici3n es correcta. En efecto, en la digesti3n triptica de cromatinas a 26°C con una relaci3n tripsina/DNA de 1:300 se ha obtenido una constante de $4.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ por titulaci3n autom3tica y de $2,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ a partir de la elevaci3n del dicroismo. El hecho de que la constante obtenida por titulaci3n autom3tica sea la mayor es consecuencia de que la ruptura de enlaces peptidicos es causa y no consecuencia de la elevaci3n de dicroismo.

El hecho de que en ambos casos las curvas experimentales se ajusten a un 3nico proceso exponencial puede deberse, adem3s de las razones aducidas en 3.2.6.2., al hecho de que, al menos cuando se sigue la digesti3n por la elevaci3n de dicroismo, en los casos en que se detectan dos procesos, las dos constantes tienen un valor muy pr3ximo en ausencia de ClNa (tabla IV).

La variaci3n de las constantes k_1 y k_2 con la fuerza i3nica, que se aprecia en la tabla IV, puede obedecer a dos motivos:

- a) Variaci3n en la accesibilidad de la tripsina impuesta por

las variaciones estructurales de la cromatina inducidas por el cambio de fuerza iónica.

- b) Diferencias en la suceptibilidad de los enlaces peptídicos en la digestión triptica. La variación de fuerza iónica puede modificar esta suceptibilidad por dos causas. En primer lugar por inducir cambios conformacionales en las histonas que modifiquen la resistencia de algunos enlaces peptídicos; por otra parte, por modificar la constante de interacción histona-DNA con la subsiguiente variación en la protección ejercida por el DNA sobre una región de la histona que interaccione con él.

A la vista de estas consideraciones, es lógico que la interpretación de la dependencia de k_1 y k_2 con respecto a la fuerza iónica sea difícil de explicar. No obstante, se pueden formular algunas hipótesis.

En primer lugar hay que preguntarse por el significado de la existencia de dos procesos exponenciales en la primera fase del aumento de dicroísmo. Una primera posibilidad sería que ambos procesos fueran consecutivos aunque no cooperativos. Esta posibilidad viene representada por el siguiente esquema:

Estado inicial	$\xrightarrow{k_1}$	Estado intermedio	$\xrightarrow{k_2}$	Estado final
(baja θ_{280})				(alta θ_{280})

Según este esquema el que se dé el segundo proceso exige que se haya dado el primero pero no en la totalidad de la fibra de cromatina, ya que en ese caso el proceso 2 no comenzaría hasta transcurrido el tiempo necesario para completar el primero en la

totalidad de la cromatina. Este modelo, sin embargo, es difícil de admitir. En efecto, θ_1 y θ_2 representarían entonces la "extensión" (medida en términos de incremento de θ_{280}) de los procesos 1 y 2 respectivamente. La tabla IV muestra que θ_1 y θ_2 varían con la fuerza iónica, lo cual implica que la estructura del "estado intermedio" variaría con la fuerza iónica. Ante la imposibilidad de definir en que consistiría dicho estado intermedio, la hipótesis puede desecharse.

La segunda posibilidad sería el que ambos procesos se dieran simultáneamente correspondiendo el primero al incremento de dicroismo que resulta de la digestión de unos determinados enlaces peptídicos y el segundo al aumento de dicroismo como consecuencia de la hidrólisis de otra serie de enlaces peptídicos. Ambas series de enlaces peptídicos serían accesibles desde el principio y su hidrólisis independiente, aunque las constantes cinéticas sean distintas.

Tomando como punto de partida esta segunda hipótesis puede elaborarse una serie de comentarios sobre la influencia de la fuerza iónica sobre los valores de las constantes cinéticas.

En las figuras 85 y 86 se recogen las variaciones de k_1 y k_2 respectivamente con la concentración de ClNa; aunque la actividad de la tripsina varía poco con la fuerza iónica en el intervalo utilizado (apartado 3.2.1.3.) los valores de k_1 y k_2 de las tablas IV y V se han corregido con los factores dados en la tabla III.

Anteriormente se ha adelantado que el primer proceso debe corresponder a la separación proteolítica de las zonas globulares

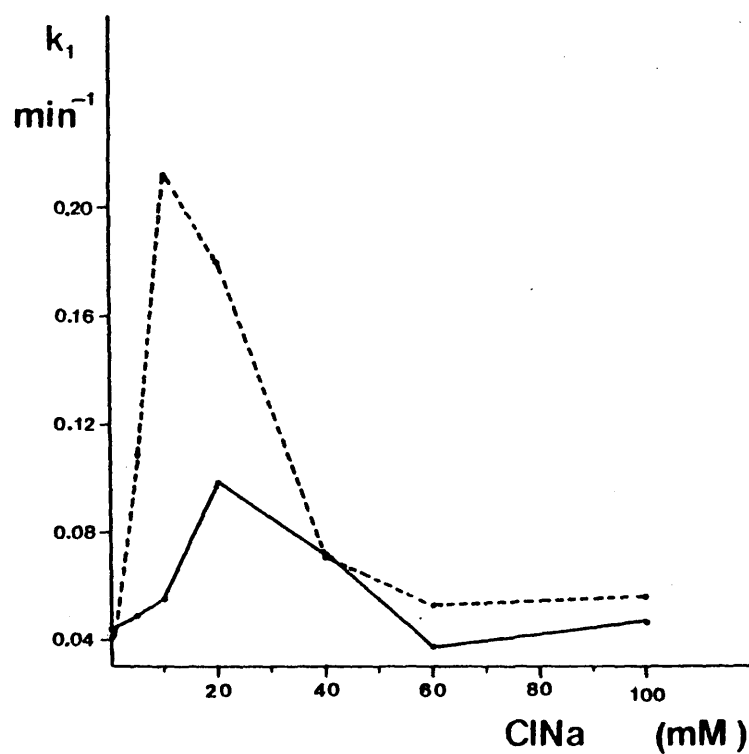


Fig. 84..- Variación de la constante k_1 con la fuerza iónica representada por la concentración de ClNa .

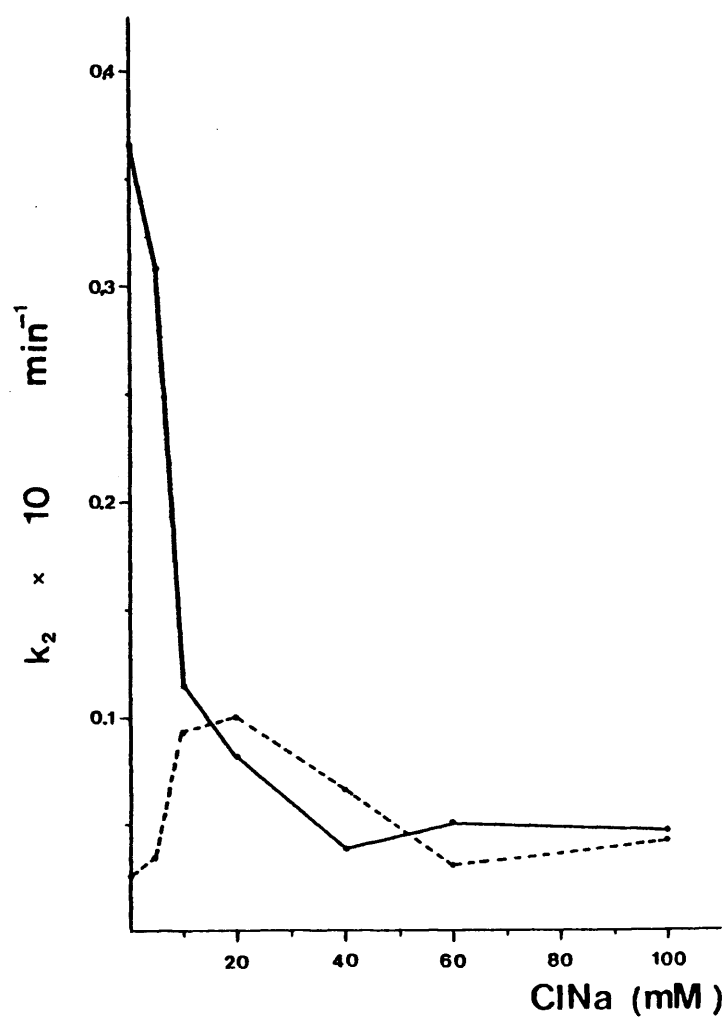


Fig. 86.- Variación de la constante k_2 con la fuerza iónica representada por la concentración de ClNa .

y las regiones N-terminales de las histonas (y C-terminales en el caso de H1 y H5). Los valores de k_1 en la cromatina nativa descienden en el intervalo de concentración 20-60 mM, es decir, cuando se organiza el solenoide (Thomma y col., 1979). Esta disminución es coherente con la hipótesis, sobre todo si se tiene en cuenta que en el solenoide las zonas globulares de H1 quedan alojadas en el hueco central y las caras mas planas de los nucleosomas en contacto. También es coherente con el hecho de que, en casi todos los valores de fuerza iónica, k_1 sea mayor en la cromatina desprovista de histonas H1/H5, que no adquiere una superestructura regular, aunque la disminución de k_1 en este caso entre 10 y 60 mM indica que la cromatina desprovista de histonas muy ricas en lisinas también se compacta al aumentar la fuerza iónica.

La elevación de k_1 que tiene lugar a fuerzas iónicas muy bajas es más difícil de explicar, pero podría deberse a la disminución de la constante de interacción entre las regiones N-terminales de las histonas y el DNA, lo que aumentaría la suceptibilidad de dichas regiones a la acción de la tripsina.

La figura 86 pone de manifiesto que, en la cromatina nativa k_2 no varía apenas en el intervalo de concentración de ClNa 20-100 mM. En este intervalo se da precisamente la formación del solenoide, lo que significa que k_2 , en principio, no se ve afectada por la superestructura de la cromatina. Sin embargo, k_2 disminuye bruscamente en el intervalo de concentración salina 0-20mM, lo que indica que este segundo proceso se dificulta al aumentar la fuerza iónica en este intervalo. Strätling (1979) ha observado que al aumentar la concentración de ClNa entre 0 y 20 mM se da un

cambio conformacional en oligonucleosomas detectable por ultracentrifugación. Este cambio no parece deberse a la adquisición de superestructura ya que se apreciaba incluso en trinucleosomas incapaces de formar una superestructura ordenada (Strätling, 1979). Por tanto, puede pensarse que el cambio observado por Strätling se debe a una cierta compactación del nucleosoma. Esto es compatible con la posibilidad de que el segundo proceso de elevación de dicroísmo corresponda a la digestión de las zonas globulares de las histonas, hipótesis que estaría también de acuerdo con los datos aportados en la figura 33 y la tabla VI. Finalmente, el hecho de que no coincida el valor de k_2 determinado en cromatina desprovista de H1/H5 con el hallado en la cromatina nativa es justificable si se tiene en cuenta que las regiones N- y C-terminales de la histona H1 se extienden a lo largo de todo el DNA nucleosomal (Belyavsky y col., 1980).

Las hipótesis anteriores sobre la naturaleza de los dos procesos observados en la primera fase del aumento de dicroísmo pueden explicar también el incremento generalizado en la accesibilidad de la cromatina a la DNasa I, como consecuencia de la digestión trípica que se ha puesto antes de manifiesto. En efecto, el incremento de dicroísmo asociado con el primer proceso, θ_1 , revela que la estructura del nucleosoma se relaja como consecuencia de la digestión trípica de las regiones N-terminales de las histonas. Es dudoso que esta elevación de dicroísmo se debe solamente a la pérdida de superestructura de la cromatina, ya que θ_{280} varía relativamente poco en el intervalo de concentraciones de ClNa en el que se producen cambios en la superestructura (Figura 26)

por lo que puede admitirse con cierta seguridad que θ_1 está relacionado con la relajación de la estructura nucleosomal, lo que permitiría un acceso generalizado a la DNasa I. Por otra parte, la tabla IV muestra que el valor de θ_1 , cuando la digestión triptica se lleva a cabo en presencia de ClNa 60mM es aproximadamente la mitad del valor que alcanza en ausencia de ClNa. De acuerdo con la presente interpretación, esto significaría que la relajación de la estructura nucleosomal como consecuencia de la digestión triptica es menor cuando se realiza en presencia de sal que cuando se realiza en su ausencia; esto justificaría a su vez el hecho de que tras la digestión con DNasa I se obtengan fragmentos mas resistentes cuando la degradación triptica se ha realizado en presencia de ClNa 60mM (Figuras 35 y 36).

Queda por comentar el significado de la segunda fase de elevación de dicroismo que se aprecia en las digestiones realizadas en medios de fuerza iónica muy baja (figuras 48 y 49) y que, por las razones indicadas en el apartado 3.2.6.2.1. debe producirse, aunque a un tiempo mas tardío y, por consiguiente, no observado, en todos los casos.

Lilley y Tatchell (1977) observaron que aún cuando la digestión triptica de los cores nucleosomales ha progresado hasta el punto de que sólo son observables trazas de los fragmentos 18-102 y 20-120 de la histona H4, el dicroismo de la cromatina residual no llega a ser el del DNA puro. Esto implica que, la digestión de las zonas globulares, que se juzga responsable del segundo proceso de la primera fase debe ir seguida de una ulterior digestión en las zonas globulares residuales que darían cuenta de la segun

da y definitiva fase de elevación de dicroísmo. Es evidente que ésta ulterior digestión requiere que se haya dado primero la digestión inicial, lo que justifica que la segunda fase sólo comience cuando se ha completado la primera.

200

CONCLUSIONES

El objeto del presente trabajo ha sido la obtención de datos acerca de la estructura de la cromatina de eritrocito de pollo y de la función que desempeñan las histonas ricas en lisina en el mantenimiento de dicha estructura. Para ello se han estudiado los efectos de la digestión con tripsina de cromatina nativa y desprovista de histonas H1/H5. A lo largo de las investigaciones reseñadas en esta memoria se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- Las histonas ricas en lisina (H1 y H5) son las mas susceptibles en la cromatina de eritrocito de pollo, a la hidrólisis triptica. La histona H1 da lugar, secuencialmente por proteólisis, a tres péptidos: P1, P2 y P3. El péptido P1 posee una movilidad electroforética análoga a la de la histona H5, el P3 migra como la histona H3 y el P2 posee una movilidad electroforética intermedia.
- 2.- De las histonas internas, la H3 es la mas susceptible a la hidrólisis y origina el péptido P4 cuya movilidad electroforética, comprendida entre la de las histonas H2A y H4, es semejante a la del péptido P1 identificado por Weintraub y Van Lente en 1974.
- 3.- La digestión de la cromatina con tripsina trae como consecuencia la progresiva pérdida de la estructura terciaria del DNA para ir adquiriendo la característica estructura del DNA en disolución, como se deduce del espectro de dicroísmo circular en la zona del ultravioleta próximo, en el que es visible la pérdida del mínimo existente en la zona 290-320 nm, la desapa

rición del hombro a 273 nm y el desplazamiento del máximo a 280 nm hacia 275 nm.

- 4.- Durante el proceso de proteólisis tiene lugar un incremento de la elipticidad máxima hasta llegar a alcanzar, una vez finalizado este, el valor característico del DNA libre. En los primeros momentos de incubación triptica, cuando ésta se realiza en condiciones muy suaves, se apreciaba una disminución de la elipticidad máxima que se relaciona con la proteólisis de las histonas ricas en lisina, como lo indica el hecho de que éste efecto esté ausente en la digestión triptica de cromatina desprovista de estas histonas.
- 5.- La constante cinética de hidrólisis de los enlaces peptídicos obtenida por titulación automática, es dos veces superior a la constante de desestructuración del DNA nucleosomal obtenida por dicroísmo circular. Este hecho se relaciona con el nexo causal que ha de existir entre ambos fenómenos.
- 6.- El incremento de elipticidad molar a 280 nm ocasionado como consecuencia de la pérdida de la estructura terciaria del DNA transcurre en dos fases. La segunda fase comienza únicamente cuando se ha completado la primera; por tanto, es necesario que se hidrolicen los enlaces peptídicos susceptibles durante la primera fase de incremento del dicroísmo para que puedan romperse los enlaces peptídicos cuya hidrólisis ocasiona la desestructuración del DNA propio de la segunda fase.

- 7.- La primera fase mencionada anteriormente está integrada por dos procesos que comienzan simultáneamente y que poseen parámetros cinéticos distintos según se deduce de los ajustes teóricos obtenidos.
- 8.- El primer proceso de desestructuración del DNA regido por la constante k_1 se produce como consecuencia de la separación proteolítica de las zonas globulares y las regiones N-terminales de las histonas (N y C-terminales en el caso de las histonas H1 y H5). Como lo indica el análisis electroforético de los péptidos presentes al finalizar ésta etapa, y los resultados obtenidos por hidrólisis con nucleasa de micrococo y DNasa I.
- 9.- La interacción entre las zonas N-terminales de las histonas y el DNA se debilita al aumentar la fuerza iónica en el intervalo de concentración de ClNa de 0 a 20 mM como se deduce del incremento de las constantes k_1 obtenidas en incubaciones triplicas de cromatina realizadas en presencia de esas concentraciones salinas.
- 10.- Las zonas N-terminales de las histonas resultan menos accesibles a la tripsina en el intervalo de fuerzas iónicas correspondientes a concentraciones de ClNa de 20 a 100 mM; esta protección es debida a la formación de superestructura en la fibra cromosomal que está descrito que se produce en ese intervalo de concentraciones salinas (Thoma y col., 1979).
- 11.- La cromatina digerida con tripsina es menos estable a una posterior hidrólisis con nucleasa de micrococo que la nativa. El

límite de digestión con nucleasa de un digerido tróptico en el cual se ha completado el primer proceso de la primera fase de elevación de dicroísmo y en el que, por lo tanto, solo están presentes las zonas globulares de las histonas es de aproximadamente 105 p.b., si bien se manifiestan pausas en la digestión al alcanzarse tamaños de alrededor de 166, 140 y 117 p.b. Ello indica que durante este período la organización nucleosomal se mantiene en cierto grado.

- 12.- Las zonas N-terminales de las histonas no son estrictamente necesarias para proteger la longitud de DNA correspondiente del core nucleosomal como se deduce de la pausa de 140 p.b. obtenida por digestión con nucleasa del digerido tróptico en que se encuentran ausentes dichas zonas.
- 13.- La zona globular de la histona H1 es capaz de proteger 10 p.b. adicionales a cada extremo del DNA del core nucleosomal como lo indica el hecho de encontrarse presente un fragmento de 166 p.b. al digerir con nucleasa un digerido tróptico en el que la histona H1 había perdido ya sus zonas N y C-terminales.
- 14.- El incremento de dicroísmo asociado con el primer proceso, θ_1 , revela que la estructura del nucleosoma se relaja como consecuencia de la hidrólisis tróptica de las zonas N-terminales de las histonas. La presencia de sales en el medio de incubación, ClNa 60 mM, reduce el grado de dicha relajación aproximadamente a la mitad como lo denotan los valores respectivos de θ_1 .

- 15.- La digestión de cromatina con tripsina provoca un aumento ge
neralizado en la sensibilidad del DNA del digerido a la DNasa
I. Cuando la incubación con DNasa I se realiza en un digerido
tríptico que se encuentra en la fase final del primer proce-
so descrito de proteólisis, el incremento de sensibilidad in
dicado anteriormente es, en especial, patente en la posición
90 del DNA del core nucleosomal, como lo indica el análisis
de la distribución de fragmentos de DNA obtenida en éstas con
diciones.
- 16.- El segundo proceso de aumento de dicroísmo regido por la cons
tante k_2 se origina por la proteólisis parcial de las zonas
globulares de las histonas como se desprende de las altera-
ciones observadas en el valor numérico de la constante k_2 al
modificar la fuerza iónica del medio de incubación. La última
parte, o segunda fase, de incremento de dicroísmo corresponde
a la proteólisis total de las zonas globulares, ya que, en
los casos en que se ha observado ésta segunda fase, su culmi
nación ha dado lugar a valores de elipticidad próximos a los
característicos del DNA libre.
- 17.- La digestión tríptica de cromatina desprovista de histonas H1
y H5 trae también como consecuencia la pérdida de estructura
terciaria del DNA. Dicha desestructuración ocurre, del mismo
modo que en el caso de cromatina nativa, en dos fases. La prí
mera fase está formada a su vez por dos procesos que comien-
zan simultáneamente y que poseen parámetros cinéticos distin
tos.

- 18.- Las constantes k_1 y k_2 que rigen los dos procesos toman valores numéricos distintos según la concentración salina presente en el medio utilizado para la digestión triptica de ésta cromatina. La constante k_1 , en el intervalo de concentración de ClNa de 0 a 20 mM, posee valores superiores a los obtenidos en los experimentos análogos realizados en cromatina nativa. Esto revela que las histonas ricas en lisina son capaces de proteger las regiones N-terminales de las histonas internas frente al ataque proteolítico.
- 19.- La cromatina desprovista de histonas H1 y H5 es capaz de adquirir superestructura como lo indica la disminución experimentada por la constante k_1 en el intervalo de concentración de ClNa de 10 a 100 mM, aunque los valores k_1 obtenidos para esta cromatina en dicho intervalo de fuerzas iónicas son ligeramente superiores a los correspondientes de cromatina nativa. La estructuración en niveles superiores de organización de la cromatina desprovista de histonas ricas en lisina ha sido descrita, en el intervalo de fuerzas iónicas citado, por Thoma y col., en 1979.
- 20.- La interpretación del significado de las fases y proceso de desestructuración del DNA en el caso de digestiones tripticas de cromatina desprovista de histonas H1 y H5 es análoga a lo ya mencionado en cromatina nativa, excepción hecha de los datos particulares concernientes a la presencia de éstas histonas.

200

BIBLIOGRAFIA

- Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. y Avilés, F.J. (1980) *Nature* 288, 675.
- Avilés, F.J., Chapman, G.E., Kneale, G.G., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 88, 363.
- Baldwin, J.P., Boseley, P.G., Bradbury, E.W. e Ibel, K. (1975) *Nature* 253, 245.
- Bekhor, D. y Samal, B. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 537.
- Belyavsky, A.V., Bavykin, S.G., Gogvadze, E.G. y Mirzabekov, A.D. (1980) *J. Mol. Biol.* 139, 519.
- Böhm, L., Crane-Robinson, C. y Sautiere, P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 106, 525.
- Boulikas, T., Wiseman, J.M. y Garrard, W.T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 127.
- Bradbury, E.M., Carpenter, B.G. y Rattle, M.W.E. (1973) *Nature* 241, 123.
- Brandt, W.F., Böhm, L. y Von Holt, C. (1975) *FEBS Lett.* 51, 88
- Butler, P.J.G. y Thomas, J.O. (1980) *J. Mol. Biol.* 140, 505.
- Carmerini-Otero, R.D., Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1976) *Cell* 8, 333.
- Campbell, A.M., Cotter, R.I. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 2877.
- Carpenter, B.G., Baldwin, J.P., Bradbury, E.M. e Ibel, K. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 1739.

- Cohen, S.S. (1945) J. Biol. Chem. 158, 255.
- Cowman, M.K. y Fasman, G.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4759.
- Chatterjee, S. y Walker, I.O. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 519.
- Cheah, K.S.E. y Osborne, D.J. (1977) Biochem. J. 163, 141.
- D'Anna, J.A., Jr e Isenberg, I. (1973) Biochemistry 12, 1035.
- D'Anna, J.A., Jr e Isenberg, I. (1974 a) Biochemistry 13, 2093.
- D'Anna, J.A., Jr. e Isenberg, I. (1974 b) Biochemistry 13, 2098.
- Dieterich, A.E., Axel, R. y Cantor, Ch.R. (1979) J. Mol. Biol. 129, 587.
- Dieterich, A.E., Eshaghpour, H., Crothers, D.M. y Cantor, Ch.R. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 2475.
- Dingman, C.W. y Sporn, M.B. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3483.
- Dixon, W.J. y Massey, F.J., Jr. (1969) Introduction to stadistical Analylis, 3rd ed. New York, McGraw-Hill, 63.
- Du Praw, E.J. (1966) Nature 209, 577.
- Fasman, G., Chou, P. y Adler, A. (1977) The Mol. Biol. of the Mammalian Genetic Apparatus (T'so, P., ed.) 1-52, North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- Felsenfeld, G. (1978) Nature 271, 115.
- Fernandez, B.A. (1979) Tesis Doctoral Fac.Ciencias-Químicas, Universidad Complutense.

- Finch, J.T. y Klug, A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1897.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M. y Klug, A. (1977) Nature 269, 29.
- Franco, L., Johns, E.W. y Navlet, J.M. (1974) Eur. J. Biochem. 45, 83.
- Fujimoto, M., Kalinski, A., Pritchard, A.E., Kowalski, D. y Laskowski, M. Sr. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7405.
- Fulmer, A.W. y Fasman, G.O. (1979) Biopolymers 18, 2875.
- Glotov, B.A., Itkes, A.V., Nikolaiev, L.G. y Severin, E.S. (1978) FEBS Letters 91, 149.
- Goodwin, G.M., Woodhead, L. y Johns, E.W. (1977) FEBS Lett. 73, 85.
- Gordon, V.C., Knobler, C.M., Olins, D.E. y Schumaker, V.N. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 660.
- Gordon, V.C., Schumaker, V.N., Olins, D.W., Knobler, C.M. y Horwitz, J. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 3845.
- Hardison, R.C., Zeitter, D.P., Murphy, J.M. y Chalkley, R. (1977) Cell 12, 417.
- Hartman, P.G., Chapman, B.E., Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977) Eur. J. Biochem. 77, 45.
- Henson, P. y Walker, I.O. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 345.
- Hewish, D.R. y Burgoyne, A.L. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504.

- Hjelm, R.P. y Huang, R.C.C. (1975) *Biochemistry* 14, 1682.
- Honda, B.M., Baillie, D.L. y Candido, E.P.M. (1974) *FEBS Lett.* 48, 156.
- Hozier, J., Renz, M. y Nehls, P. (1977) *Chromosome* 62, 301.
- Isenberg, I. (1979) 48, 159.
- Itkes, A.V., Glotov, B.O., Nikolaev, L.G., Preem, S.R. y Severin, E.S. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8, 507.
- Johns, E.W. y Butter, J.A.V. (1962) *Biochem. J.* 111, 371.
- Kato, Y. e Iwai, K. (1977) *J. Biochem.* 81, 62.
- Kawashima, S. e Imahori, K. (1979) *J. Biochem.* 85, 197.
- Kelley, R.I. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1588.
- Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.J. y Thomas, J.O. (1980) *Nature* 287, 509.
- Kornberg, R.D. y Thomas, J.O. (1974) *Science* 184, 865.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680.
- Lawson, G.M. y Cole, R.D. (1979) *Biochem.* 18, 2160.
- Lestourgeon, W.M. y Rusch, H.P. (1973) *Archiv. Biochim. Biophys.* 155, 144.
- Lewis, E.A., De Buysere, M.S. y Ress, A.W. (1976) *Biochemistry* 15, 186.

- Lilley, D.M.J. y Tatchell, K. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 2039.
- Lohr, D., Kovacic, R.T. y Van Holde, K.E. (1977) *Biochemistry* 16, 463.
- Lopez-Braña, I. (1979) Tesis Doctoral. Fác. Ciencias Químicas, Universidad Complutense.
- Lutter, L.C. (1978) *J. Mol. Biol.* 124, 391.
- Luzzati, V. y Nicolaief, A. (1963) *J. Mol. Biol.* 7, 142.
- Maniatis, T., Jeffrey, A. y Van de Sande, M. (1975) *Biochemistry* 14, 3787.
- Marion, C. y Roux, B. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 4431.
- Marks, D.B. y Schumaker, V.N. (1968) *Biochem. J.* 109, 625.
- Marks, D.B. y Keller, B.J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 598.
- Marks, D.B. y Keller, B.J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 134.
- Martinson, H.G. y McCarthy, B.J. (1975) *Biochemistry* 14, 1073.
- Martinson, H.G. y McCarthy, B.J. (1976) *Biochemistry* 15, 4126.
- Martinson, H.G., True, R.J. y Burch, J.B.E. (1979) *Biochemistry* 18, 1082.
- McGhee, J.D. y Felsenfeld, G. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 1113.
- McGhee, J.D., Rou, D.C., Charney, E. y Felsenfeld, G. (1980) *Cell* 22 87.

- Mirzabekov,A.D., Shick,V.V., Belyavsky,A.V. y Bavykin,S.G. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 75, 4184.
- Mirzabekov,A.D. (1981) Trends. Biochem. Sci. 9, 240.
- Morris,R. (1976) Cell 8, 357.
- Moss,T., Cary,P.D., Crane-Robinson,C. y Bradbury,E.M. (1976) Biochemistry 15, 2261.
- Neelin,J.M., Callahan,P.X., Lamb,D.C. y Murray,K. (1964) Canad. J. Biochem. Physiol. 42, 1743.
- Noll,M (1974 a) Nature 251, 249.
- Noll,M. (1974 b) Nucleic Acids Res. 1, 1573.
- Noll,M., Thomas,J.O. y Kornberg,R.D. (1975) Science 187, 1203.
- Noll,M. y Kornberg,R.D. (1977) J. Mol. Biol. 109, 393.
- Noll,M., Zimmer,S., Engel,A. y Dubochet,J. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 21.
- Olins,A.L. y Olins,A.D. (1973) Science 183, 330.
- Oudet,P., Gross-Belland,M. y Chambon,P. (1975) Cell 4, 281.
- Oudet,P., Spadafora,C. y Chambon,P. (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 301.
- Pardon,J.F. y Wilkins,M.H. (1972) J. Mol. Biol. 68, 115.
- Pardon,J.F., Wilkins,M.H.F. y Richards,B.M. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 3199.

- Paul, J., Gilmour, R.S., Affara, N., Birnie, G., Harrison, R., Hell, A.
Humphries, S., Windass, J. y Young, B. (1973) Cold. Spring. Harbor.
Symp. Quant. Biol. 38, 773.
- Peacock, A.C. y Dingman, C.W. (1967) Biochemistry 6, 1818.
- Perera, J. (1979) Cuadernos de Biología Molecular, 1, 93.
- Phillips, G. y Gigot, C. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 3617.
- Philip, M., Jamaluddin, M., Sastry, R.V.R. y Chandra, H.S. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5178.
- Philip, M., Jamaluddin, M. y Chandra, H.S. (1980) Biochim. Biophys.
Acta 607, 408.
- Pospelov, V.A., Svetlikova, S.B. y Vorobe'ev, V.I. (1979) Nucleic.
Acids Res. 6, 399.
- Puigdoménech, P., Dabau, R.R., Palau, J., Podo, F., Guidone, L. y An-
drea, P. (1977) Temussi Biochim. Biophys. Acta 492, 12.
- Rasmussen, P.S., Murray, K. y Luck, J.M. (1962) Biochemistry, 1, 79.
- Reeck, G.R., Simpson, R.T. y Soler, H.A. (1972) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA. 69, 2317.
- Renz, M., Nehls, P. y Hozier, J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74, 1879.
- Richards, B.M., Pardon, J.F., Lilley, D., Cotter, R. y Wroley, J. (1977)
Cell Biol. int. Rep. 1, 107.
- Rill, R. y Van Holde, K.E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1080.

- Ring, D. y Cole, R.D. (1979) Biochem. 18, 2160.
- Ris, H. (1975) The structure and function of chromatin. Ciba Foundation 28, ASP (Elsevier-Excerpta Medica-North Holland) Amsterdam p. 7.
- Sahasrabudhe, C.G. y Van Holde, K.E. (1974) J.B.C. 249, 152.
- Schmidt, E.R. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2169.
- Schmitz, K.S. y Ramanathan, B. (1980) J. Theor. Biol. 83, 297.
- Shaw, B.R., Herman, T.M., Kovacic, R.T., Beauchamp, G.S. y Van Holde, K.E. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 13, 505.
- Shick, V.V., Belyavsky, A.V., Bavykin, S.G. y Mirzabekov, A.D. (1980) 139, 491.
- Simpson, R.T. (1972) Biochemistry 11, 2003.
- Simpson, R.T. y Whitlock, J.P. Jr. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 117.
- Simpson, R.T. (1978 a) Nucleic Acids Res. 5, 1109.
- Simpson, R.T. (1978 b) Biochemistry 17, 5524.
- Simpson, R.T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10123.
- Singer, D.S. y Singer, M.F. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 2531.
- Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1975) Biochemistry 14, 2915.
- Sollner-Webb, B., Camerini-Otero, R.D. y Felsenfeld, G. (1976) Cell 9, 179.

- Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1977) Cell 10, 537.
- Sollner-Webb, B., Melchior, W. y Felsenfeld, G. (1978) Cell 14, 611.
- Spadafora, C., Bellard, M., Compton, J.L. y Chambon, P. (1976) FEBS Lett. 69, 281.
- Stein, A., Bina-Stein, M. y Simpson, R.T. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2780.
- Strätling, W.H. (1979) Biochemistry 18, 596.
- Suau, P., Bradbury, E.M., Baldwin, J.P. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 593.
- Suda, M. e Iwai, K. (1979) J. Biochem. 86, 1659.
- Thomas, J.O. y Kornberg, R.D. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2626.
- Thomas, M., White, R.C. y Davis, R.W. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2294.
- Thoma, F., Koller, T.H. y Klug, A. (1979) J. Cell. Biol. 83, 403.
- Trifonov, E. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 1371.
- Tsanev, R. y Petrov, P. (1976) J. Microsc. Biol. Cell. 27, 11.
- Vakayeva, T.G. y Bakayev, V.V. (1978) Molec. Biol. Rep. 4, 185.
- Van Holde, K.E., Sahasrabudhe, Ch. G. y Shaw, B.R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1365.
- Van Lente, F., Jackson, J.F. y Weintraub, H. (1975) Cell 5, 45.

- Weintraub,H. y Van Lente,F. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4249.
- Weintraub,H., Palter,K. y Van Lente,F. (1975) Cell 6, 85.
- Weintraub,H., Woncel,A. y Alberts,B. (1976) Cell 9, 409.
- Weischet,W.O., Tatchell,K., Van Holde,K.E. y Klump,H. (1978) Nu
cleic Acids Res. 5, 139.
- Whitlock,J.P., Jr. y Simpson,R.T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6516.
- Whitlock,J.P. y Stein,A. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3857.
- Wilhelm,X. y Champagne,M. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 102.
- Wilkins,M.H., Zubay,G. y Wilson, (1959) J. Mol. Biol. 1, 179.
- Wong,N.T.N. y Candido,E.P.M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8263.
- Worcel,A. (1978) Molecular Architecture of the Chromatin Fiber.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 313.
- Wu,H.M., Dattagupta,N., Hogan,M. y Crotthers,D.M. (1979) Bioche
mistry 18, 3960.
- Zinke,M. (1980) Studia Biophysica 81, 100.

